

# AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

# LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4 Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10 <u>http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\_droi.php</u> <u>http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm</u> **UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I** 



N° attribué par la bibliothèque

## THESE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY 1** 

en Biologie Santé Environnement

Spécialité : Génie Biologique et Médical

Présentée et soutenue publiquement le 12 Janvier 2001

par

**Corinne Bour épouse Dill** 

# DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES ANTHRACYCLINES : IMPLICATION DANS LE PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE INDUITE ET LE PHENOTYPE DE RESISTANCE PLEIOTROPE

Directeurs de thèse : Dr. J. L. Merlin

**Rapporteurs** :

Jury:

Pr. M. Manfait (Reims)
Dr. J. P. Jaffrezou (Toulouse)
Dr. M. L. Viriot (Nancy), *Présidente*Pr. F. Guillemin (Nancy)
Dr. J. L. Merlin (Nancy)

# **ABREVIATIONS**

#### Partie bibliographique

ABC protéines : ATP-binding-cassette proétines ADN, ARN : acide désoxyribonucléique ou ribonucléique AIF : Apoptosis inducing factor ARA protein : Anthracycline Resistance Associated protein AMP-c : adénine monophosphate-cyclique AT-MDR : altered multidrug resistance ATP, GTP : adénosine ou guanosine triphosphate CAK : Cdk-Activating-Kinase CBP : CAAT box-binding Factor CDK : Cyclin Dependent Kinase CFTR ; cystic fibrosis transmembranar conductance regulator CMF : cytométrie en flux CPC : cancer bronchopulmonaire à petites cellules CPNC : cancer bronchopulmonaire non à petites cellules CRF : c-AMP responding factor D : profondeur de champs DG ou DAG : diacylglycérol DMC : double-minute chromosome DNR : daunorubicine DSB, SSB : Double or Single Strand Break DXR : doxorubicine EPI : epirubicine ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>: gap 1 et 2 GSH : glutathion GSSG : glutathion réduit GST : glutathion S-transférase HSR : homogeneously stained region IDA : idarubicine IP<sub>3</sub>: inositoltriphosphate LAL : leucémie aiguë lymphoblastique LAM : leucémie aiguë myeloblastique M : mitose LRP : Lung resistance-related protein MAP kinase : Pitogen Activating Kinase MDR : multidrug resistance MF : microscopie de fluorescence MOAT : multispecific organic anionic transporter MPF: Maturation Promoting Factor MRP : Multidrug resistance Related Protein MSF : microspectrofluorimétrie NA : numerical aperture NBD : nucleotide-binding domain OSM : Optical serial microscopy PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol biphosphate P-gp : permeability-glycoprotein PKA : protein kinase A PKC : protein kinase C RE : réticulum-endoplasmique S : synthèse Smase : sphyngomyélinase TBP : TATA box-binding protein Topo IIa : Topoisomérase II alpha Topo II $\beta$ : Topoisomérase II beta WD : Working distance  $\Delta \phi$ : variation du potentiel membranaire

## REMERCIEMENTS

A l'ensemble des membres de mon jury de thèse : je tenais à vous remercier pour vos conseils et vos encouragements aux moments les plus délicats.

*Mr le Pr M Manfait* : Votre disponibilité m'a permis de profiter au mieux de vos remarques et ainsi, de recentrer certaines des données et d'en préciser d'autres. Merci de m'avoir fait partager votre expérience dans le domaine de l'instrumentation.

*Mr le Dr JP Jaffrezou* : C'est la portée de vos travaux qui m'a incitée à prendre contact avec votre équipe. Mais, c'est, sans conteste, votre accueil ainsi que votre intérêt pour les travaux externes à votre unité qui ont traduit, à mes yeux, votre ouverture d'esprit propre aux scientifiques.

*Mme le Dr ML Viriot* : Le caractère humain des conseils que vous prodiguez valorise votre attachement au travail cohérent et précis. Merci pour le temps que vous avez consacré à mon manuscrit de thèse ainsi que votre soutien chaleureux.

*Mr le Pr F Guillemin* : J'ai appris à apprécier le caractère visionnaire de certaines de vos idées, mais surtout à remettre en question régulièrement l'orientation du travail. Merci d'avoir toujours laissé votre porte et votre esprit ouverts aux discussions malgré votre emploi du temps chargé.

*Mr JL Merlin* : C'est vous qui m'avez accueilli dans votre équipe et qui m'avez orienté sur ce thème riche en opportunités de développement, merci. Votre conception de la "libre entreprise" m'a permis d'acquérir des compétences polyvalentes, qui préparent particulièrement à mener à bien un projet de recherche.

Au personnel du Centre Alexis Vautrin.

Voilà tout s'achève, alors merci à l'ensemble des membres des unités *LRO* et *IMAC* avec lesquels j'ai travaillé et/ou que j'ai côtoyé.

J'ai tout de même une pensée particulière pour Sophie et Carole, nos techniciennes de chocs, qui m'ont initiée respectivement à leur domaine de prédilection.

Et puis il y a les compagnons de longues soirées "laborieuses", Lina (qui m'a rapidement éclairé sur la distinction entre les notions de "*data*" et "*résultats*"), Marie-Hélène, Stéphanie....

Mais également les compagnons de journée avec leur bonne humeur, Nathalie, Juan José, Christophe, Gisèle...

Enfin Dominique, merci pour ta disponibilité dans toutes ces démarches administratives, en particulier ces derniers mois, ainsi que pour ton caractère apaisant et ton esprit d'à propos. Aux nouveaux, je souhaite une bonne dose de persévérance et d'enthousiasme.

Mr Martel : merci pour la qualité de vos travaux de reprographie ainsi que votre efficacité toujours égale à elle même !

Aux différentes personnes extérieures au CAV avec qui j'ai travaillé :

••••

Je salue et remercie Isabelle Plot, Guadalupe Solis Recendez, Edwige Bossu, E Humbert...

**Jean Charles**. je t'aime. Merci pour ton Amour. ta tendresse. le bonheur. et ta formidable capacité d'écoute. Mais surtout garde ta pelle ;-)

**Camille**, je t'aime "de tout mon cœur à crevant". J'espère rapidement ne plus avoir constamment à surveiller ma foutue montre....

Ces paroles m'ont tant émue quand je les ai découvertes le premier mois de ta vie.

La tendresse (Bourvil, 1963) Paroles et Musique: Noël Roux, Hubert Giraud

On peut vivre sans richesse Presque sans le sou Des seigneurs et des princesses Y'en a plus beaucoup Mais vivre sans tendresse On ne le pourrait pas Non, non, non, non On ne le pourrait pas

On peut vivre sans la gloire Qui ne prouve rien Etre inconnu dans l'histoire Et s'en trouver bien Mais vivre sans tendresse Il n'en est pas question Non, non, non Il n'en est pas question

Quelle douce faiblesse Quel joli sentiment Ce besoin de tendresse Qui nous vient en naissant Maman, maman, maman

Le travail est nécessaire Mais s'il faut rester Des semaines sans rien faire Eh bien... on s'y fait Mais vivre sans tendresse Le temps vous paraît long Long, long, long, long Le temps vous parait long

Dans le feu de la jeunesse Naissent les plaisirs Et l'amour fait des prouesses Pour nous éblouir Oui mais sans la tendresse L'amour ne serait rien Non, non, non, non L'amour ne serait rien

Quand la vie impitoyable Vous tombe dessus On n'est plus qu'un pauvre diable Broyé et déçu Alors sans la tendresse D'un cœur qui nous soutient Non, non, non, non On n'irait pas plus loin

Un enfant vous embrasse Parce qu'on le rend heureux Tous nos chagrins s'effacent On a les larmes aux yeux Mon Dieu, mon Dieu, mon Dieu... Dans votre immense sagesse Immense ferveur Faites donc pleuvoir sans cesse Au fond de nos cœurs Des torrents de tendresse Pour que règne l'amour Règne l'amour Jusqu'à la fin des jours

## NOTRE FAMILLE. NOS AMIS

**Patricia**, cette thèse t'appartient aussi un peu. Ju en es l'un des éléments moteur depuis Sarrebourg, puis Strasbourg, et enfin Rennes. Prends soin de toi, de Max et Ugo ainsi que de ton cher Jef.

**Maman**, t'es formidable. J'espère que Camille sera aussi fière de moi que je le suis de toi. J'essaierai de lui transmettre certains principes que tu m'as inculqués je crois : la persévérance. la tolérance et le respect.

Quant à toi, **Maurice**, merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et l'Amour que tu apportes à maman.

**Gio et David**. Vous êtes nos amis pour la vie ! Merci Gio, pour ces 15 dernières années. Elisa sera sa meilleure amie...

A Marie-Claude, Jean-Marie, Anne Sof, Manu (Cléa et Carl). mémé et mamie. Votre accueil m'a beaucoup touché. ainsi que la traditionnelle et si joyeuse famille que vous formez.

Papa, tes filles out grandi. Max, Ugo et Camille sont encore tout petits !

**Marie-Pierre et Vlada**. J'ai appris à apprécier vos compétences au labo, et à découvrir vos qualités au cours de nos longues conversations. Je vous souhaite bien des choses.

A nos copains qui ont partagé ces dernières années des moments hauts en couleurs : Fred. 7of Reel. Sophie et Michel. Nelly et Jérome. l'équipe "Sony ES7".

#### Partie expérimentale

A : absorbance ARN<sub>tx</sub> : ARN totaux BSA : albumine sérique bovine c : concentration °C : degré Celsius CCD : charge coupled device cell. : cellules CMF : cytométrie de flux CSA : cyclosporine A DiOC<sub>6</sub>: iodure de 3,3'-dihexyloxacarbocyanine fdn : filtre de densité neutre AO : Acridine-Orange ε : coefficient d'extinction molaire h : heure <sup>3</sup>H DNR : daunorubicine marquée au tritium <sup>3</sup>H Pal : acide palmitique marqué au tritium IC<sub>50</sub>, IC<sub>90</sub> : concentration d'inhibiton de croissance cellulaire de 50 % ou de 90 % IEC50 ou IEC90 : inhibition iso-effective de 50 % ou 90% IP : Iodure de propidium IR : Indice de résistance Kda : kilogramme Dalton 1 : largeur de la cuve LT : lysotracker M : molaire (mole par litre) MD : miroir dichroïque MF : microscopie de fluorescence min : minute MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltétrazolium NBD : NBD-C<sub>6</sub>-céramide : 6-(n-(7 nitrobenz-20xa-1,3-diazol-4 yl) amino) caproyl n': nombre d'expériences nd : non déterminé nm : 10<sup>-9</sup> métre (nanométre) Noy/Cy : ratio noyau / cytoplasme ns : non significatif PB : passe-bande PH : passe-haut PKC : protéine kinase C PSC: SDZ-PSC 833 PSF : Point spread function PVDF : fluorure de polyvinylidène RER : ratio d'expression relatif RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain RPMI : Roswell Park Memorial Institut  $\rho$ : ratio de fluorescence s : seconde (s): significatif SIT : system intensifiated transmission

# SOMMAIRE

Chapitre I : Introduction	. 5
Chapitre II : Historique	. 7
I LES ANTHRACYCLINES	. 7
1. Historique	. 7
2. Structure et propriétés physico-chimiques	. 7
3. Activités biologiques	9
3.1. Pharmacocinétique	. 10
3.2. Mécanismes d'action	. 10
3.3. Distribution et sites d'actions associés aux mécanismes d'action des anthracyclines	. 18
3.4. Schéma d'induction de mort cellulaire	. 22
4. Indications thérapeutiques et toxicité	. 22
II LA RESISTANCE AUX ANTHRACYCLINES	. 25
1. Présentation générale	. 25
2. Activation des mécanismes de réparation et de détoxification	. 25
2.1. Résistance associée aux topoisomérases	. 26
2.2. Résistance associée au glutathion (GSH) et aux enzymes associés (GSTs)	. 26
3. La résistance associée aux protéines de transport	. 28
3.1. Les différentes classes de transporteurs	28
3.2. Aspect moléculaire, structural et fonctionnel de la glycoprotéine-P et de la	
multidrug resistance related protein	. 29
3.3. Mécanismes d'action de la P-gp et de la MRP	33
4. La modulation de la résistance	35
4.1. Spécificité d'action	35
4.2. Applications	. 36
5. Applications en clinique.	. 36
5.1. Les techniques de détection des gènes et protéines	36
5.2. Les facteurs prédictifs en chimiothérapie	. 37
III LA REPONSE CELLULAIRE AUX ANTHRACYCLINES	. 41
1. Le cycle cellulaire	. 41
1.1. Rappels : les phases du cycle	. 41

1.2. Contrôle de la division	42
2. La mort cellulaire.	. 44
2.1. La transmission du signal	. 44
2.2. Les différents processus de mort cellulaire	. 45
3. Processus impliqués par les anthracyclines	. 49
3.1. Signalisation et régulation de l'expression génique	. 50
3.2. Arrêts du cycle et mort cellulaire	. 51
4. Apoptose et phénotype classique MDR	. 53
4.1. La résistance à l'apoptose	. 53
4.2. Relation(s) entre la résistance à l'apoptose et le phénotype MDR	. 55
Chapitre III : Partie Expérimentale	. 58
I OBJECTIFS	. 58
II MATERIELS ET METHODES	. 61
1. Substances chimiques.	. 61
1.1. Les anthracyclines	. 61
1.2. Les modulateurs.	. 61
2. Lignées cellulaires et prélèvements leucémiques	. 61
2.1. Lignées cellulaires	. 61
2.2. Prélèvements leucémiques	63
3. Etude de la cytotoxicité	. 63
4. Microscopie de fluorescence	65
4.1. Dispositif expérimental	. 65
4.2. Méthodes d'expérimentations en microscopie de fluorescence	. 74
5. Spectrofluorimétrie	. 79
6. Cytométrie en flux	. 79
6.1. Immunomarquages	. 79
6.2. Accumulation et efflux des anthracyclines	79
6.3. Détection du pic sub-G <sub>1</sub>	. 81
7. Evaluation d'éléments radio-marqués	. 82
7.1. Incorporation daunorubicine tritiée	. 82
7.2. Métabolisme d'acide palmitique	. 82
8. Evaluation relative d'ARNm de gènes d'intérêt par RT-PCR semi-quantitative	. 83

8.1 Extraction GANN.       8.5         8.2. Transcription inverse.       84         8.3. PCR semi-quantitative.       84         8.4. Analyse des produits de PCR.       86         9. Analyse de l'expression des protéines par Western-blot.       87         9.1. Principe expérimental.       87         9.2. Extraction et dosage des protéines.       87         9.3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide.       88         9.4. Traitements des échantillons.       88         9.5. Transfert.       89         9.6. Marquage.       89         9.7. Révélation.       90         10. Statistiques.       90         11. RESULTATS.       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       92         3. L. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison de spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       102		02
82. Transcription inverse.       84         83. PCR semi-quantitative.       84         84. Analyse des produits de PCR.       86         9. Analyse de l'expression des protéines par Western-blot.       87         9.1. Principe expérimental.       87         9.2. Extraction et dosage des protéines.       87         9.3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide.       88         9.4. Traitements des échantillons.       88         9.5. Transfert.       89         9.6. Marquage.       89         9.7. Révélation.       90         10. Statistiques.       90         11 RESULTATS.       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       99         3.1. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine sur prélèvements       104         5.3. Discussion-Conclusions.       107	8.1. Extraction d'ARN.	. 83
8.3. PCR semi-quantitative.       84         8.4. Analyse des produits de PCR.       86         9. Analyse de l'expression des protéines par Western-blot.       87         9.1. Principe expérimental.       87         9.2. Extraction et dosage des protéines.       87         9.3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide.       88         9.4. Traitements des échantillons.       88         9.5. Transfert.       89         9.6. Marquage.       89         9.7. Révélation.       90         10. Statistiques.       90         110. Statistiques.       90         111 RESULTATS.       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       99         3.1. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire. <t< td=""><td>8.2. Transcription inverse</td><td>84</td></t<>	8.2. Transcription inverse	84
8.4. Analyse des produits de PCR.       86         9. Analyse de l'expression des protéines par Western-blot.       87         9.1. Principe expérimental.       87         9.2. Extraction et dosage des protéines.       87         9.3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide.       88         9.4. Traitements des échantillons.       88         9.5. Transfert.       89         9.6. Marquage.       89         9.7. Révélation.       90         10. Statistiques.       90         11. RESULTATS       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       99         3.1. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.       104         5.3. Discussion-Conclusions.       107       6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation	8.3. PCR semi-quantitative	. 84
9. Analyse de l'expression des protéines par Western-blot.       87         9.1. Principe expérimental.       87         9.2. Extraction et dosage des protéines.       87         9.3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide.       88         9.4. Traitements des échantillons.       88         9.5. Transfert.       89         9.6. Marquage.       89         9.7. Révélation.       90         10. Statistiques.       90         91. RESULTATS.       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       99         3.1. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison de spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.       104         5.3. Discussion-Conclusions.       107       6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la mo	8.4. Analyse des produits de PCR	. 86
9.1. Principe expérimental.       87         9.2. Extraction et dosage des protéines.       87         9.3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide.       88         9.4. Traitements des échantillons.       88         9.5. Transfert.       89         9.6. Marquage.       89         9.7. Révélation.       90         10. Statistiques.       90         11. RESULTATS.       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       99         3.1. Analyses semi-quantitatives.       90         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.       104         5.3. Discussion-Conclusions.       107       6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements       116       7.1. Modu	9. Analyse de l'expression des protéines par Western-blot	. 87
9.2. Extraction et dosage des protéines	9.1. Principe expérimental	. 87
9.3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide	9.2. Extraction et dosage des protéines	87
9.4. Traitements des échantillons	9.3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide	88
9.5. Transfert.       89         9.6. Marquage.       89         9.7. Révélation.       90         10. Statistiques.       90         11. RESULTATS.       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       99         3.1. Analyses semi-quantitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.       104         5.3. Discussion-Conclusions.       107       6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements       116         10.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.1. Modulation de l'accumulation in tracellulaire de la daunorubicine       117         7.3. Discussion-Conclusions.       123	9.4. Traitements des échantillons	. 88
9.6. Marquage	9.5. Transfert	. 89
9.7. Révélation.       90         10. Statistiques.       90         11. RESULTATS.       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       99         3.1. Analyses semi-quantitatives.       99         3.2. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.         104       5.3. Discussion-Conclusions.       107         6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements       116         10.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.1. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine.       117         7.3. Discussion-Conclusions.       123	9.6. Marquage	. 89
10. Statistiques.       90         III RESULTATS.       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       99         3.1. Analyses semi-quantitatives.       99         3.2. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.       104         5.3. Discussion-Conclusions.       107       6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements       116         7.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine.       117         7.3. Discussion-Conclusions.       123	9.7. Révélation	. <b>9</b> 0
III RESULTATS.       91         PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE.       91         1. Introduction générale.       91         2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro.       92         3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro.       99         3.1. Analyses semi-quantitatives.       99         3.2. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.         104       5.3. Discussion-Conclusions.       107         6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements       116         10.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.1. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine       117         7.3. Discussion-Conclusions.       123	10. Statistiques	. 90
PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE	III RESULTATS	. 91
1. Introduction générale	PARTIE 1 : DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE	, 91
2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro	1. Introduction générale	91
3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro. 99         3.1. Analyses semi-quantitatives	2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro	. 92
3.1. Analyses semi-quantitatives.       99         3.2. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.       104         5.3. Discussion-Conclusions.       107       6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements       116         7.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine       117         7.3. Discussion-Conclusions.       123	3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro	. 99
3.2. Analyses qualitatives.       100         4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102       102         5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.       104         5.3. Discussion-Conclusions.       107         6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements       116         7.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine       117         7.3. Discussion-Conclusions.       123	3.1. Analyses semi-quantitatives	99
4. Discussion-Conclusions.       101         5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro.       102         5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102         5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire.       104         5.3. Discussion-Conclusions.       107         6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements       116         7.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine       117         7.3. Discussion-Conclusions.       123	3.2. Analyses qualitatives	100
<ul> <li>5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro</li></ul>	4. Discussion-Conclusions	101
5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution 102         5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire	5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro	. 102
5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire	5.1. Comparaison des spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution	n 102
5.3. Discussion-Conclusions.       107         6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro.       108         7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements       108         leucémiques.       116         7.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine       117         7.3. Discussion-Conclusions.       123	5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire	. 104
<ul> <li>6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro</li></ul>	5.3. Discussion-Conclusions	107
<ul> <li>7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements</li> <li>leucémiques</li></ul>	6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro	. 108
leucémiques.       116         7.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine       117         7.3. Discussion-Conclusions.       123	7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvement	s
7.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine.       116         7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine	leucémiques	. 116
<ul> <li>7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine</li></ul>	7.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine	. 116
7.3. Discussion-Conclusions 123	7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine	. 117
	7.3. Discussion-Conclusions	123

PARTIE 2 : REPONSE CELLULAIRE AUX ANTHRACYCLINES	126
1. Introduction générale	126
2. Evaluation de critères de pharmacologie cellulaire	126
2.1. Accumulation et cinétique de rétention intracellulaire des anthracyclines	126
2.2. Distribution intracellulaire de la fluorescence induite par les anthracyclines	129
2.3. Discussion-Conclusions	132
3. Réponse cellulaire aux anthracyclines	133
3.1. Comparaison de la cytotoxicité pour différentes durées d'incubation	133
3.2. Evaluation de l'impact sur le cycle cellulaire associé au processus de mort	
cellulaire	135
3.3. Discussion-Conclusions	143
3.4. Rôle de P53 dans le processus d'induction de mort cellulaire par les anthracyclines.	145
3.5. Résultats préliminaires : rôle des céramides	149
3.6. Discussion-Conclusions	150
Chapitre IV : CONCLUSIONS - PERSPECTIVES	153
Chapitre V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	156
ANNEXES	174
Travaux scientifiques	
Liste des figures et travaux	

# HISTORIQUE



# Chapitre I : Introduction

La chimiothérapie représente une voie standard des traitements antitumoraux. Les anthracyclines font parties des procédures de chimiothérapie le plus souvent indiquées. Cependant, l'apparition d'une résistance est la cause majeure d'échec de leur application. La résistance aux anthracyclines est souvent associée à un mécanisme de résistance pleiotropique la *multidrug resistance* (MDR). Le phénotype MDR est "classiquement" lié aux protéines de transport membranaire qui présentent une affinité pour les anthracyclines. C'est pourquoi, des anthracyclines de seconde génération ont été développées. Toutefois et malgré le fait que les anthracyclines soient étudiées depuis une trentaine d'années, leurs mécanismes d'action restent encore incertains. Le processus d'induction de mort cellulaire reste un sujet particulièrement controversé. D'ailleurs le caractère multifactoriel de la résistance aux anthracyclines semble impliquer les mécanismes de régulation de l'apoptose.

Dans une étude bibliographique préalable, nous développerons différents thèmes d'actualités parmi les connaissances acquises concernant les anthracyclines et leurs mécanismes de résistances. Dans un premier temps nous présenterons les anthracyclines, avec un intérêt particulier pour l'impact des modifications de leur structure sur leur propriété pharmacologique et leur mode d'action. Puis nous développerons un chapitre dédié à la résistance aux anthracyclines et principalement au phénotype MDR. Enfin la réponse cellulaire aux anthracyclines sera présentée ainsi que les voies possibles altérant l'induction de l'apoptose par les anthracyclines.

Notre travail de recherche sera présenté en deux parties. La première partie comprend les matériels et méthodes qui ont été mis en œuvre, ainsi que les critères qui ont motivé leur sélection. La seconde partie présente les résultats obtenus, leur discussion, et enfin les conclusions qui s'imposent. Deux thèmes ont été abordés de façon indépendantes, toutefois ils comportent certains aspects complémentaires.

D'une part, l'étude de la distribution de la daunorubicine, une anthracycline de référence a été menée *in vitro* et sur prélèvements cliniques. Ce travail a porté principalement sur la caractérisation *in vitro* de la séquestration cytoplasmique de la daunorubicine et sa

modulation dans le phénotype MDR associé à la surexpression de la P-gp. Puis une étude préliminaire de ce phénomène a été réalisée dans le contexte clinique.

D'autre part, l'évaluation *in-vitro* de deux anthracyclines de seconde génération (idarubicine et épirubicine) a été réalisée sur des modèles cellulaires adhérents. Ces lignées cellulaires de cancer comprennent des modèles de phénotype MDR associé à la surexpression de différentes protéines de transport (glycoprotéine-P et *multidrug resistance related protein*). Ces modèles permettent d'étudier les antharcyclines en fonction de critères de pharmacologie cellulaire (accumulation, rétention, et distribution), ainsi qu'en fonction de la réponse cellulaire provoquée par le traitement effectué (modification du cycle cellulaire, mort cellulaire, voie(s) d'induction de la mort cellulaire).

Enfin, nous proposerons différentes perspectives envisageables dans le cadre de ce thème, afin de poursuivre et d'élucider des questions qui sont aujourd'hui encore d'actualité.

## Chapitre II : Historique

#### I LES ANTHRACYCLINES

#### 1. Historique

Au début des années 60, des chercheurs Français et Italiens ont isolé simultanément la même molécule antibiotique à partir de souches de *Streptomyces caeroleorubidus* et *peucetius*. Le nom italien de cet antibiotique fut daunomycine (Di Marco et al., 1963), et le nom français fut rubidomycine (Dubost et al., 1963) pour enfin de compte être actuellement distribué sous le nom de daunorubicine ou daunomycine. L'activité antitumorale de cet antibiotique fut rapidement mise en évidence et il devint le chef de file d'une famille d'anticancéreux appartenant à la famille des anthracyclines. La doxorubicine (adriamycine), un analogue 14-hydroxy de la daunorubicine, fut isolée d'une souche mutante de *Streptomyces peucetius (var. caesius)* (Arcamone et al., 1969). Depuis les années 70 de nombreuses anthracyclines ont été développées au cours d'études *in vitro* et *in vivo*, et ont montré une large diversité dans leurs actions biologiques et chimiques. Parmi les analogues testés dans des études précliniques, beaucoup se sont avérés décevants en phase d'essais cliniques I et II (Muggia et Green, 1991)

#### 2. Structure et propriétés physico-chimiques

La structure chimique des anthracyclines inclut deux composants : un composant polycyclique aromatique (tétracycline) correspondant à la portion *aglycone (anthraquinone)*, et un composant sucré (glucosamine) correspondant à la *daunosamine* (*Figure 1*).



Anthracyclines	Sigle	R1	R2	R3	R4	R5
Daunorubicine	DNR	OCH <sub>3</sub>	Н	0	Н	OH
Doxorubicine	DXR	OCH <sub>3</sub>	OH	0	Н	OH
Epirubicine	EPI	OCH3	OH	0	OH	Н
Idarubicine	IDA	H	Н	0	Н	OH

Figure 1 : Structure chimique des anthracyclines (Prat et al., 1994).

#### Propriétés physico-chimiques

Les anthracyclines sont amphiphiles, et des bases faibles avec un  $pK_a$  approximatif de 8,6 (Gallois et al., 1996) pour les molécules indiquées dans la *Figure 1*. De ce fait, ces molécules à pH physiologique (7,2-7,4) et à 20°C portent une seule charge positive au niveau du groupe amine de la daunosamine, et sont neutres au niveau de la structure polycyclique. Ces molécules se différencient par leur caractère lipophile défini par leurs substituants. L'évaluation des coefficients de partition met en évidence des molécules de caractère hydrophobe faible pour la doxorubicine, intermédiaire pour la daunorubicine et élevé pour l'idarubicine (Gallois et al., 1996). Les anthracyclines sous leur forme chlorydrate sont solubles dans l'eau, le méthanol, l'éthanol et les solutions hydroalcooliques.

La structure polycyclique aromatique attribue à cette famille d'anticancéreux un groupe chromophore porteur d'une propriété de fluorescence. Les mesures de l'intensité de fluorescence permettent d'évaluer la concentration des anthracyclines. De plus l'analyse des modifications des spectres de ces molécules permet non seulement une évaluation de leur concentration, mais également la mise en évidence d'interactions entre elles ou avec leur environnement. Les différents travaux fondamentaux de l'équipe de *Garnier-Suillerot* ont porté sur les variations spectroscopiques d'une série d'anthracyclines (Gallois et al., 1998, Gallois et al., 1996, Laigle et al., 1996). En solution éthanolique, les spectres mesurés indiquent un état monomère de référence. En solution aqueuse les résultats varient en fonction de la concentration. A forte concentration pour la doxorubicine et la daunorubicine l'intensité de fluorescence n'est plus corrélée à la concentration et les ratio de fluorescence sont modifiés, impliquant un état d'équilibre entre les formes monomères et dimères (Laigle et al., 1996), alors que l'idarubicine même à forte concentration reste sous forme monomère (Gallois et al., 1998).

#### Méthodes de détection des anthracyclines

Lorsque l'anthracycline est marquée par un isotope (tel que le tritium), il est possible de réaliser des quantifications absolues (Merlin et al., 1995 a). Il est également possible d'exploiter les propriétés de fluorescence des anthracyclines par différents outils d'analyse. La concentration peut être quantifiée en valeurs relatives par cytométrie en flux (Merlin et al., 1994), et/ou absolues par spectroscopie de fluorescence classique, microspectrofluorimétrie (Belhoussine et al., 1998, Gallois et al., 1996), et par des techniques de chromatographie (Brenner et al., 1985). Les interactions entre elles ou avec les compartiments cellulaires

peuvent être étudiées par les techniques de spectroscopie de fluorescence (Gallois et al., 1998, Gallois et al., 1996, Laigle et al., 1996). Enfin, leur distribution subcellulaire peut être analysée par les techniques d'imagerie en microscopie de fluorescence (Duffy et al., 1996, Lampidis et al., 1997, Merlin et al., 1995 a).

#### 3. Activités biologiques

En dépit du fait que les anthracyclines soient utilisées de façon considérable en clinique, et étudiées depuis plus de 30 ans, leur(s) mécanisme(s) d'action reste(nt) encore incertain(s) et fait (font) toujours l'objet de controverses.

De nombreux mécanismes d'action ont été proposés pour ces agents :

• Les anthracyclines sont des agents intercalants dans l'ADN impliquant :

- des inhibitions de synthèse de macromolécules,
- des formations d'adduits d'ADN et de liaisons croisées,
- l'altération de l'activité de l'hélicase,
- des lésions de l'ADN par inhibition de la topoisomérase II.

• Les anthracyclines peuvent produire des radicaux libres, induisant des lésions à l'ADN et/ou des peroxydations lipidiques.

• Les anthracyclines peuvent avoir un effet direct sur les membranes.

Parmi ces mécanismes, il s'agit de discerner ceux qui sont compatibles avec l'application clinique. Pour ce faire, il est nécessaire de considérer les doses administrées aux patients et les concentrations effectives au niveau de la tumeur.

Pour une administration en *bolus*, la concentration plasmatique initiale détectée est approximativement de 2 à 5  $\mu$ M pour décliner rapidement (1 h après) à une concentration approximative de 0,3  $\mu$ M (Brenner et al., 1985, Greene et al., 1983). Cette dernière concentration est du même ordre de grandeur que la concentration obtenue et maintenue au cours d'une administration en continu (Brenner et al., 1985, Greene et al., 1983, Speth et al., 1987 a, et b). C'est pourquoi, même si les études impliquant un contact avec des cellules intactes pour des concentrations extracellulaires supérieures à 1  $\mu$ M peuvent apporter des informations sur les mécanismes d'action potentiels de ces agents, elles ne peuvent que difficilement refléter le mécanisme d'action dans des conditions d'utilisation en clinique.

#### 3. 1. Pharmacocinétique

Les voies de métabolisme sont similaires quelle que soit l'anthracycline. La conversion par réduction en hydroxyle est majeure, alors que la conversion en aglycone est mineure, voire artéfactuelle. Ces métabolites ont une cytotoxicité moindre par rapport à leur molécule mère, à l'exception de l'idarubicinol (Prat et al., 1994).

La voie d'injection standard des anthracyclines est la voie intraveineuse (l'idarubicine peut être administrée par voie orale). Leur schéma d'administration est modulé par la dose, selon leur toxicité cardiaque potentielle, et la modalité d'injection en *bolus* ou en perfusion. Leur taux de liaison aux protéines plasmatiques est de l'ordre de 80-90%. Les phases de distribution et d'élimination suivent des modèles exponentiels tri-phasiques de décroissance (souvent simplifié à un modèle bi-phasique). La phase de distribution correspond à la répartition plasmatique, l'incorporation et au métabolisme tissulaire. Elle se traduit par des temps de demi-vie plasmatique brèves respectivement de l'ordre de 10 à 30 min et de 1 à 10 h La phase d'élimination tissulaire est relativement longue avec des temps de demi-vie plasmatique de l'ordre de 30 à 40 h (Robert et Gianni, 1993). Les anthracyclines traversent peu les barrières placentaires et hématoencéphaliques. Et enfin, l'élimination s'effectue principalement dans la bile et faiblement dans les urines.

#### 3. 2. Mécanismes d'action

#### 3.2.1. Intercalation dans l'ADN

Les anthracyclines se lient de façon non covalente aux doubles-brins de l'ADN pour former un complexe [ADN-anthracycline]. Les interactions dans ce complexe sont de deux ordres, hydrophobes et électrostatiques. Les interactions électrostatiques impliquent d'une part, le groupe amine chargé positivement en  $C_3$ ' de la daunosamine des anthracyclines, et d'autre part le groupe phosphate chargé négativement de l'ADN (Priebe et Perez Soler, 1993). Les interactions hydrophobes impliquent la structure anthraquinone des anthracyclines, par l'intermédiaire des cycles aromatiques B, C et D, et les paires de bases de l'ADN (Booser et Hortorbagyi, 1994). Les liaisons hydrophobes se traduisent par un empilement (*stacking*), qui pourrait expliquer l'atténuation de la fluorescence émise par les anthracyclines en présence d'ADN (Barthwal et al., 1994). Les sites d'intercalation ne sont pas spécifiques mais sélectifs pour les triplets de bases (Pyrimidine-Adénine-Pyrimidine), et se situent préférentiellement dans des régions associées à des délétions et de substitutions de bases (Anderson et al., 1991).

#### 3.2.1.1. Inhibition de la synthèse de macromolécules

Les différents travaux menés à ce sujet sur un panel de lignées cellulaires, principalement pour la daunorubicine et/ou la doxorubicine, ont montré une inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN pour des concentrations respectivement de l'ordre de 0,2 à 5  $\mu$ M (Dano et al., 1972, Di Marco et al., 1965) et 2 à 100  $\mu$ M (Momparler et al., 1976). Cependant la relation entre l'inhibition de synthèse de l'ADN et l'effet cytotoxique reste discutée, en particulier pour les faibles concentrations (Siegfried et al., 1983).

#### 3.2.1.2. Formation d'adduits d'ADN et liaisons-croisées

Les hypothèses concernant les voies d'inhibition de la biosynthèse des acides-nucléiques (ADN et ARN) reposent sur une intercalation directe des anthracyclines et/ou par inhibition de l'activité de l'ADN-polymérase (Gewirtz, 1999). Cependant, la formation d'adduits ou de liaisons croisées d'ADN n'a été montrée que pour des concentrations inhibants 90% de la croissance ( $IC_{90}$ ) (Skladanowski et Konopa, 1994).

#### 3.2.1.3. Inhibition de l'hélicase

La mise en évidence de l'altération, par les anthracyclines, de l'enroulement ou de la séparation des brins de l'ADN par inhibition de l'hélicase a été effectuée uniquement dans des expérimentations en solution sans cellule (Gewirtz, 1999).

#### 3.2.1.4. Inhibition de la topoisomérase II

Les topoisomérases sont des enzymes chargées de réguler les conversions topologiques de l'ADN et de permettre le bon fonctionnement nucléaire. Elles sont classées en deux types d'enzymes I et II. Les topoisomérases de classe I produisent des cassures simples brins transitoires de l'ADN selon un mécanisme ATP-indépendant, et sont principalement actives pendant la transcription et l'élongation. Les topoisomérases de classe II induisent des cassures doubles brins transitoires de l'ADN afin de permettre à un segment de l'ADN de passer à travers un autre. Ces dernières enzymes consomment de l'énergie par hydrolyse d'ATP pour réverser la liaison de l'enzyme à l'ADN et permettre plusieurs cycles catalytiques (*Figure 2*). Leur fonction est essentielle durant de nombreuses étapes du métabolisme de l'ADN incluant : la réplication, la transcription, la suppression des recombinaisons, la ségrégation et la condensation des chromosomes pendant la mitose et probablement la méiose. Tous les organismes ont plus d'une topoisomérase pour chaque type : *Escheria coli* a deux

topoisomérases de type I (topoisomérase I et III) et deux de type II (topoisomérase II, ou gyrase, et IV) ; chez les eucaryotes il est apparu l'existence de multiples enzymes de type I et II. Les topoisomérases II ont deux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ , codées par des gènes et chromosomes différents. Leur expression fluctue en fonction du cycle cellulaire : pour l'isozyme  $\alpha$  le niveau d'expression et d'activité protéique maximale se situe dans la phase G<sub>2</sub>/M du cycle, alors que l'isozyme  $\beta$  à un maximum pour les cellules quiescentes (Isaacs et al., 1995).



Figure 2 : Mécanisme d'inhibition de la topoisomérase II (Isaacs et al., 1995).

Les cassures de l'ADN par les anthracyclines sont principalement double-brins et s'effectuent par l'intermédiaire de complexes [ADN-anthracycline-protéine]. *Tewey et al.* ont mis en évidence *in vitro* sans cellule et sur cellules intactes, que la protéine associée à ces complexes est la topoisomérase II (Tewey et al., 1984). Les anthracyclines en s'intercalant à l'ADN stabilisent le complexe transitoire de clivage [DNA-enzyme] et empêchent de façon réversible la religation des brins (*Figure 2*). L'inhibition de cette enzyme provoque un arrêt du cycle cellulaire en  $G_2/M$ , puis des aberrations chromosomiques, des échanges entre chromatides sœurs et la mort cellulaire. Les cellules en  $G_0$  ne possédant que peu de topoisomérases II $\alpha$ sont peu sensibles à ces agents.

L'étude de la relation entre les sites d'intercalation des anthracyclines, les sites de stabilisation du complexe formé et les clivages de l'ADN, permet la compréhension du mécanisme d'inhibition de la topoisomérase II et donc des effets létaux induits. Les expériences menées sur modèle sans cellule ont montré que la topoisomérase II présente des sites prévalants de clivage (Capranico et al., 1990 a). En présence de doxorubicine, les sites de stabilisation sont différents des sites de clivage (Capranico et al., 1990 a). En présence et al., 1990 b). La revue de *Booser et al.* décrit quelles sont les structures des anthracyclines s'intercalant à l'ADN (Booser et Hortorbagyi,

quelles sont les structures des anthracyclines s'intercalant à l'ADN (Booser et Hortorbagyi, 1994). Le cycle D en position (C<sub>4</sub>) est particulièrement impliqué dans l'intercalation outre les positions (C<sub>7</sub>, <sub>9</sub>, <sub>11</sub> et <sub>14</sub>) de l'aglycone et les positions (3'-N et 4') de la daunosamine. L'importance structurale des anthracyclines se traduit dans la relation entre l'induction de dommages à l'ADN et leur toxicité. D'une part, les résultats obtenus pour des doses équitoxiques évaluées pour une lignée de colon montrent que le degré des dommages induits à l'ADN est fonction de l'anthracycline (Belvedere et al., 1989). D'autre part, les cassures d'ADN sont peu ou pas corrélées avec la cytotoxicité aux concentrations de daunorubicine ou de doxorubicine inférieures à 0,5  $\mu$ M, malgré un effet antiprolifératif important, évaluées pour deux lignées cellulaires différentes (Fornari et al., 1996, Munger et al., 1988).

#### 3.2.2. Production des radicaux libres

#### 3.2.2.1. Production de radicaux libres

Selon *Prat el al.*, les radicaux libres dérivés de l'oxygène sont générés par le cycle rédox des dérivés quinone des anthracyclines (Prat et al., 1994). Ils sont modifiés par une réduction à un électron en semiquinone ou à deux électrons en dérivés dihydroquinone (Prat et al., 1994). Ces dérivés peuvent soit léser directement l'ADN, soit interagir avec l'oxygène moléculaire pour produire des radicaux anions superoxydes ( $O_2^{\bullet}$ ), hydroxyles ( $\bullet$ OH) ou de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui sont cytotoxiques au niveau des mitochondries, de l'ADN et des membranes. La voie majeure de production de radicaux hydroxyles apparaît par deux réactions dépendantes du fer (Fe). Elles sont présentées pour la doxorubicine (*Figure 3*). Le premier mécanisme (voie I) est une réduction de Fe(III) en Fe(II) par l'anion superoxyde ou le dérivé semiquinone, suivie d'une réaction entre Fe(II) et  $H_2O_2$  Le second mécanisme (voie II) implique une réaction directe entre le complexe [anthracycline-Fe(III)] et ( $H_2O_2$ ).

Voie I : Réduction du fer

 $O'_2$  + Fe (III)  $\longrightarrow$   $O_2$  + Fe (II) doxorubicine semiquinone + Fe (III)  $\longrightarrow$  doxorubicine + Fe (II) Fe (II) +  $H_2O_2$   $\longrightarrow$  Fe (III) + OH + OHVoie II : Complexe DXR-Fe(III)  $doxorubicine \cdot be (IIi)$ 2GSH +  $H_2O_2$   $\longrightarrow$  GSSG + OH + OH

Figure 3 : Production de radicaux hydroxyles (•OH) dépendante du Fe pour la doxorubicine. GSH, glutathion et GSSG, glutathion réduit (Prat et al., 1994).

Les radicaux hydroxyles ou anions superoxydes peuvent initier un cycle de peroxydation lipidique des membranes cellulaires. Ces espèces radicalaires éliminent l'hydrogène des acides gras insaturés pour produire des radicaux libres d'acide gras. Ces derniers réagissent avec l'oxygène moléculaire pour générer des radicaux peroxydes d'acides gras. D'une part l'extraction d'un proton d'une molécule d'acide gras permet de former un peroxyde lipidique, et d'autre part, de générer un nouveau cycle de peroxydation lipidique (Prat et al., 1994).

#### 3.2.2.2. Implication dans la toxicité tumorale

Deux questions restent posées dans la revue de *Gewirtz* (Gewirtz, 1999) : i) les radicaux libres sont-ils générés pour les concentrations appliquées en clinique et dans des conditions physiologiques intratumorales et ii) les radicaux libres peuvent-ils être à l'origine de la toxicité tumorale pour les anthracyclines ?

> Les modèles d'études *in vitro* recensés pour détecter des espèces radicalaires sont, soit des systèmes sans cellule, soit des cellules intactes. Rapidement des équipes, dans des conditions *in vitro* sans cellule et principalement avec la doxorubicine, ont détecté des radicaux hydroxyles (Bachur et al., 1977) endommageant l'ADN (Feinstein et al., 1993) mais à des concentrations supra-cliniques (10 à 500  $\mu$ M). Plus récemment, des radicaux libres associés à des lésions de l'ADN ont été mis en évidence pour la doxorubicine avec des cellules intactes, mais à de fortes concentrations (5  $\mu$ M) (Fornari et al., 1994). L'utilisation d'agents protecteurs des radicaux libres a été effectuée pour étayer l'hypothèse de leur implication dans la sensibilité aux anthracyclines. Les expérimentations ont été réalisées sur cellules intactes, mais soit la gamme de concentrations était trop forte (5-200  $\mu$ M), soit les résultats obtenus étaient contradictoires aux faibles concentrations (Gewirtz, 1999). Concernant la

peroxydation lipidique des membranes, deux problèmes limitent l'interprétation des résultats : la localisation de l'événement (intra- ou extracellulaire) et les conditions expérimentales, aussi bien pour les modèles d'étude, que les concentrations d'anthracyclines et d'oxygène (Gewirtz, 1999).

Si l'origine de la cardiotoxicité issue des anthracyclines est bien établie, c'est-à-dire par la production de radicaux libres initiant des altérations des mitochondries ainsi qu'une peroxydation lipidique à la surface des cellules, les mécanismes induisant la cardiotoxicité restent encore souvent dissociés de l'effet antitumoral (Gewirtz, 1999).

#### 3.2.3. Production de messagers lipidiques

Les interactions entre l'ADN et les anthracyclines ou la production de radicaux libres ont été largement décrites, par contre l'étude des mécanismes pléïotropiques de génération des céramides et de leur rôle dans la mort cellulaire s'est développée ces dernières années.

#### 3.2.3.1. Organisation générale

Les membranes sont organisées en deux feuillets lipidiques, dans lesquels sont incorporés des protéines, glyco-protéines, oligosaccharides ou glycolipides.

> Les lipides membranaires des cellules animales appartiennent principalement au groupe des phospholipides. On y trouve également des sphingolipides et du cholestérol en quantité variable selon les types cellulaires (Albert et al., 1995). Les phospholipides sont composés d'un glycérol phosphorylé associé à deux "queues" hydrophobes d'acides gras et une "tête" hydrophile. Les molécules présentées dans la *Figure 4* interviennent de façon majeure dans la signalisation intracellulaire. Dans le groupe des phosphatidylinositols (PI) existe un groupe minoritaire, le phosphatidylinositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>). Son hydrolyse par la phospholipase C (PLC) conduit à la formation du diacylglycérol (DG) et d'inositoltriphosphate (IP<sub>3</sub>) (*Figure 4*). Les sphingolipides ont pour constituant de base la sphingosine. Les céramides résultent d'un ajout d'une "queue" d'acide gras, à laquelle peut être ajoutée une "tête" hydrophile telle que la phosphorylcholine pour former les sphingomyélines (*Figure 4*).



Figure 4 : B et C) molécules de signalisation cellulaire intracellulaire importante ; B) formation de 2 IP<sub>3</sub> et DG par hydrolyse de PiP<sub>2</sub> ; C) sphingomyéline (sphingophospholipides) (Albert et al., 1995).

Les caractéristiques générales des lipides confèrent à la membrane l'essentiel de ses caractéristiques de base dont nous ne considérerons que quelques unes (Albert et al., 1995). Le premier rôle des lipides, par leur nature amphiphile, est celui de la compartimentation. L'organisation en bicouches des membranes leur confère des propriétés dans les phénomènes de diffusion à travers les membranes, mais également de fluidité. Les différents phospholipides et céramides sont synthétisés à la surface cytosolique du réticulum endoplasmique (RE). Les céramides sont alors convertis en sphingolipides au niveau de l'appareil de Golgi. Le mécanisme du trafic membranaire jusqu'à la membrane plasmique reste indéfini (Albert et al., 1995).

#### 3.2.3.2. Rôles et régulations des céramides dans la réponse cellulaire au stress

La revue de *Hannun et al.* met en exergue la fonction de "biostat" des céramides qui détermine la réponse au stress cellulaire (Hannun, 1996). Différents agents exogènes ont été identifiés comme activateur de la voie des céramides tels que : 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$ , interleukine-1 (IL-1), Fas-Ligand, acide rétinoique, progestérone, radiation ionisante, agents chimiothérapeutiques, chaleur, facteur de croissance (Hannun, 1996). L'accumulation de céramides peut soit induire la différentiation, l'apoptose, la sénescence, l'arrêt du cycle ou de la croissance. Quoiqu'il en soit, le changement de concentration intracellulaire en céramides en réponse à ces agents précède ces effets cellulaires. En outre les traitements des cellules par des analogues de céramides tels que le C<sub>2</sub>- et C<sub>6</sub>-céramide ou par une modification indirecte du contenu endogène en céramides (ex : précurseurs de céramides), ont impliqué les mêmes effets cellulaires (Hannun, 1996).

Il y a différentes sources possibles d'accumulation de céramides en réponse à des stimuli extracellulaires et des agressions cellulaires (Hannun, 1996).

Sphingomyélinase. Les études en cours mettent en cause la sphingomyéline comme le précurseur majeur des céramides, et la sphingomyélinase comme l'enzyme principale responsable de la production de céramides. Au moins quatre sphingomyélinases différentes sont impliquées dans des voies distinctes de synthèse : une sphingomyélinase dépendante du Zinc, une sphingomyélinase neutre indépendante du  $Mg^{2+}$ , une sphingomyélinase neutre dépendante du  $Mg^{2+}$  localisée au niveau de la membrane cytoplasmique, une sphyngomyélinase acide dépendante du  $Mg^{2+}$  lyso-endosomale, ces deux dernières sont associées aux agents inducteurs d'apoptose.

La synthèse de novo. La synthèse de novo des céramides implique la céramide synthase localisée dans le réticulum endoplasmique (RE). Cette enzyme est stimulée par l'acide rétinoique, les échanges de milieu de culture, les radiations ionisantes et les agents chimiothérapeutiques.

*Le métabolisme du céramide.* La production de céramide peut également être accrue par l'inhibition de la glucosylcéramide synthase, l'activation de la glucosylcéramidase ou encore par inhibition de la céramidase (Hannun, 1996).

#### 3.2.3.3. Implications des céramides dans la toxicité tumorale des anthracyclines

Les études fondamentales ont été réalisées essentiellement pour la daunorubicine (Bose et al., 1995, Jaffrezou et al., 1996) et la doxorubicine (Lavie et al., 1997) et explorées en condition *in vitro* pour des lignées cellulaires leucémiques (Bose et al., 1995, Come et al., 1999 b, Jaffrezou et al., 1996, Plo et al., 1999) et de façon moindre pour des lignées adhérentes (Lavie et al., 1997, Liu et al., 1999). A ce jour deux "écoles" se confrontent sur l'origine des céramides issus du traitement par la daunorubicine ou la doxorubicine. D'une part, les céramides s'accumuleraient selon une cinétique d'apparition biphasique transitoire dans les minutes suivant le stress, et impliqueraient une amplification modeste de l'accumulation de céramides de l'ordre de 1,5 fois (Jaffrezou et al., 1996). Cette voie de synthèse résulterait de l'activation d'une sphingomyélinase neutre (Jaffrezou et al., 1996). D'autre part, les céramides s'accumuleraient selon une cinétique d'apparition progressive durant plusieurs heures pour une amplitude d'accumulation de céramide de 3 à 5 (Liu et al., 1999, Lucci et al., 1999 b). Cette dernière voie résulterait de l'activation de la céramide synthase, mais n'exclut pas dans

une phase initiale l'intervention de la voie sphingomyéline (Bose et al., 1995, Lucci et al., 1999 b)

Les divergences des résultats proviennent principalement des conditions expérimentales. Les stratégies choisies concernant les contacts avec les anthracyclines sont radicalement différentes selon les équipes. La voie d'activation des céramides impliquant la sphingomyélinase résulte de contact court (1 h) de daunorubicine à des concentrations entre 0,5 et 1  $\mu$ M (Come et al., 1999 b, Jaffrezou et al., 1996). L'activation de la céramide synthase résulte de contact long (24 à 96 h) de daunorubicine ou de doxorubicine à des concentrations variant de 0,1 à 10  $\mu$ M (Bose et al., 1995, Liu et al., 1999, Lucci et al., 1999 a). En outre, il est probable que les voies d'activation de synthèse des céramides dépendent du mode de culture (lignées en suspension ou adhérentes). Cependant la toxicité des anthracyclines *via* les céramides ne semble pas spécifique d'une action antitumorale. Elle a pu être mise en évidence avec la doxorubicine en contact court (1 h) à 0,5  $\mu$ M, *in vitro* sur des myocytes de rat en culture (Andrieu-Abadie et al., 1999), et *in vivo* sur des ventricules de rat après injection intra-péritonéale à 14 mg/kg (Delpy et al., 1999). Par contre, le mécanisme enzymatique semble spécifique puisque au niveau des myocytes, l'enzyme impliquée serait une sphingomyélinase acide (Andrieu-Abadie et al., 1999).

#### 3. 3. Distribution et sites d'action associés aux mécanismes d'action des anthracyclines

L'effet cytotoxique des anthracyclines est influencé par son incorporation intratumorale et intracellulaire, ainsi que par sa localisation subcellulaire. La compréhension des paramètres régissant la distribution intratumorale/intracellulaire, ainsi que l'identification des sites d'action majeurs rationaliseraient la sélection des dérivés d'anthracyclines.

#### 3.3.1. Transport membranaire

Les anthracyclines sont incorporées par diffusion à travers la membrane plasmique (Burke et al., 1987, Skovsgaard et Nissen, 1982). Leur accumulation intracellulaire est fonction de leur cinétique d'incorporation qui dépend de mécanismes passifs d'influx et d'efflux. Quant aux mécanismes actifs d'efflux, ils seront présentés dans le chapitre dédié à la résistance aux anthracyclines.

> Le développement des dérivés d'anthracyclines, a révélé le caractère fondamental des paramètres moléculaires qui modulent la diffusion de ces composés. Pour stabiliser les anthracyclines au sein de la couche lipidique, deux types d'interactions interviennent : i)

électrostatiques entre la charge positive du groupe amine de la daunosamine et la charge négative des composants lipidiques anioniques, et ii) hydrophobes entre l'anthraquinone et les hydrocarbones intégrés dans la membrane. A ce jour, il est établi que les anthracyclines diffusent au sein de la membrane lipidique sous leur forme neutre par mouvements de "flipflop" à travers la bicouche. Les travaux de Gallois et al. sur une série d'anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, idarubicine, leurs dérivés 3'-hydroxyles et 13-hydroxyles, pirarubicine, WP619 et 620) dans des modèles membranaires nuancent cet état de fait. Les anthracyclines de charge et/ou d'hydrophobicité différentes étaient capables de s'intégrer au sein des membranes lipidiques. Les paramètres électrostatiques étaient sans influence sur leur intégration, par contre ils déterminaient le pourcentage des formes neutres et chargées se liant à la membrane (Gallois et al., 1996). Le caractère hydrophobe détermine l'aspect conformationnel des interactions "médicament-lipide". Pour des proportions élevées de phospholipides anioniques par molécule d'anthracycline, les interactions de la doxorubicine, daunorubicine, idarubicine et idarubicinol s'effectuent par le biais d'espèces monomères. Pour des ratio faibles de phospholipides anioniques par médicament, les interactions s'effectuent par espèces monomères pour la doxorubicine (liaisons électrostatiques) et la daunorubicine (liaisons électrostatiques et hydrophobes), et par espèces dimères (selon une association oligomère avec les phospholipides) pour l'idarubicine (Gallois et al., 1998).

Ces propriétés ont des implications directes dans l'accumulation des anthracyclines aussi bien au niveau intracellulaire qu'intratumoral.

Des études *in vitro* sur cellules adhérentes en monocouche ou en suspension ont mis en évidence des différences significatives au niveau de l'incorporation en fonction du caractère lipophile des molécules. Parmi les anthracyclines les plus couramment comparées, la doxorubicine et la 4'-épi-doxorubicine (épirubicine) sont les moins hydrophobes, la daunorubicine a un caractère hydrophobe intermédiaire par rapport à différentes anthracyclines très lipophiles (chargées ou neutres) telles que la 4-démethoxy-daunorubicine (idarubicine), 3'-désamino-4'épi-3'-hydroxy-2'-iodo-4-déméthoxydoxorubicine (annamycine), la 9-alkyl-4 hydroxy-aglycone et 4'-trisaccarride daunorubicine (aclarubicine), 4'-*O*-tétrahydropropanyl-doxorubicine (pirarubicine, THP-dxr,) la 4'-iododoxorubicine (Iodo-dxr), la 3'-hydroxy-3'-déamino-doxorubicine (hydroxyrubicine, WP159), ou des benzyl-doxorubicine (AD288, WP 546, AD198, WP 549). Cette propriété lipophile se traduit dans leur cinétique d'incorporation par une vitesse d'influx accrue comme pour l'hydroxyrubicine

(WP159) (Priebe et Perez Soler, 1993), l'idarubicine et l'iododoxorubicine (Praet et al., 1996), et/ ou par une accumulation intracellulaire totale augmentée comme pour l'aclarubicine (Lehne et al., 1996), l'annamycine (Ling et al., 1993), la THP-DXR (Bennis et al., 1997, Pignon et al., 1995), l'idarubicine (Bennis et al., 1997, Praet et al., 1996), ou les benzyldoxorubicines (Lampidis et al., 1997, Lothstein et al., 1992).

Ces propriétés se révèlent d'autant plus importantes pour les tumeurs solides dont le microenvironnement extracellulaire plus acide ne favorise pas la diffusion des bases faibles comme les anthracyclines (Parkins et al., 1996). En outre, le contexte tridimensionnel des tumeurs solides implique des propriétés biologiques particulières telles que les communications intercellulaires, des aires de cellules proliférantes en superficie et quiescentes en profondeur, l'apparition de région nécrotique au centre. Pour améliorer l'incorporation de ces molécules, différentes stratégies ont été employées comme la vectorisation par les liposomes (Forssen et al., 1996, Merlin et al., 1995 b), ou par l'évaluation d'anthracyclines dérivées interagissant préférentiellement avec des membranes riches en cholestérol comme l'idarubicine et l'idarubicinol (Gallois et al., 1998).

## 3.3.2. Sites intracellulaires de l'action antitumorale

L'identification des sites majeurs d'inactivation cellulaire peut être menée selon différentes approches. L'une de ces approches consiste à comparer l'activité cytotoxique des composés et leur distribution intracellulaire (Lampidis et al., 1997). Les études de distribution subcellulaire des anthracyclines sont largement réalisées par des techniques de microscopie, mettant ainsi à profit leur propriété de fluorescence. Une autre approche, pour déterminer les sites intracellulaires cruciaux pour l'action antitumorale, consiste à établir une relation causale entre les dommages induits aux organites et la cytotoxicité globale. Cette démarche peut être établie par différentes méthodes : 1) effet-dose comparable à la courbe d'effet-dose cytotoxique (Binaschi et al., 1997), 2) cinétique d'induction des dommages comparable à la cinétique d'effet cytotoxique (Jaffrezou et al., 1996), 3) perte comparable du dommage et de l'effet cytotoxique (Bose et al., 1995, Ling et al., 1993).

Comme nous avons pu le voir précédemment par les mécanismes d'actions, le noyau, les mitochondries et les membranes cellulaires des cellules tumorales sont des cibles potentielles des anthracyclines.

Le noyau. Pour les anthracyclines de référence telles que la daunorubicine ou la doxorubicine, une quantification par marquage radioactif sur différentes lignées (K562, MCF-7) a permis de déterminer que la localisation principale est nucléaire (≈70%) par rapport à la distribution cytoplasmique (≈30%) (Marguardt et Center, 1992, Merlin et al., 1995 a). L'interprétation de la distribution intracellulaire des anthracyclines par microscopie de fluorescence doit tenir compte du phénomène de quenching en présence d'ADN. Ce quenching de fluorescence (en condition d'excès d'ADN par rapport à l'anthracycline) est de l'ordre de 95% pour des anthracyclines telles que la doxorubicine, la daunorubicine, l'épirubicine, l'idarubicine, et la THP-dxr (Duffy et al., 1996, Laigle et al., 1996). Dans ces conditions, il est possible néanmoins de comparer leur distribution subcellulaire. Les critères pertinents des dommages à l'ADN nucléaire comprennent la quantité de cassures générées (dose-dépendant ou à équitoxicité), la persistance des cassures (cinétique de réparation), et la localisation génomique des lésions (Binaschi et al., 1997). L'étude comparative de Binaschi et al. entre des anthracyclines de référence (doxorubicine, daunorubicine) et de structure modifiée pour la lignée HL-60 en exposition courte (1 h), a montré une corrélation variable entre la cytotoxicité et les cassures d'ADN liées à la topoisomérase II. Leurs résultats ont mis en évidence que la relative médiocre efficacité des anthracyclines de référence était associée à leur faible potentiel d'induction de cassures doubles-brins, et que ces deux paramètres étaient optimisés par réduction du caractère basique en 3'. Cette modification structurale implique une recrudescence des cassures (à équitoxicité), une cinétique rapide de réparation (inférieure à 2 h) ainsi qu'une localisation génomique différente des lésions induites. Cependant, l'analyse de ces résultats devenait moins facile pour des molécules comme l'idarubicine, qui était la plus efficace en terme de cytotoxicité, mais impliquant la même séquence d'affinité que les molécules mères et une cinétique intermédiaire de réparation. Des résultats similaires, obtenus pour la lignée leucémique murine P388, ont été décrits pour une molécule de structure proche, l'annamycine (Ling et al., 1993). Pour ces molécules, l'hypothèse émise concernant leur cytotoxicité met en cause une incorporation plus rapide (par leur caractère lipophile) associée à des mécanismes d'action situés au niveau nucléaire (cassures d'ADN associées à la topoisomérase II) combinés à des sites cytoplasmiques.

Cytoplasme et membrane cellulaire. Les études de distribution subcellulaire d'anthracyclines dérivées pour des lignées en suspension et/ou adhérentes, ont corrélé l'augmentation du caractère lipophile (que les molécules soient chargées ou neutres) avec leur distribution

cytoplasmique (Duffy et al., 1996, Lampidis et al., 1997, Lehne et al., 1996, Lothstein et al., 1992). Leur localisation cytoplasmique était soit diffuse pour l'AD198 et WP549 (Lampidis et al., 1997), soit diffuse et vésiculaire pour l'AD 288 et WP 546 (Lampidis et al., 1997), l'idarubicine (Duffy et al., 1996) et l'aclarubicine (Lehne et al., 1996), et enfin vésiculaires pour l'AD 198 (Lampidis et al., 1997). Les membranes sont des sites d'action cytoplasmiques potentiels *via* l'activation de production de céramides mis en évidence pour la daunorubicine (Jaffrezou et al., 1996). La voie "sphingomyéline" de production membranaire des céramides pourrait être initiée par des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène issues des anthracyclines (Mansat-de Mas et al., 1999) et qui altèrent également les mitochondries.

#### 3. 4. Schéma d'induction de mort cellulaire

La maîtrise des mécanismes réactionnels cytotoxiques des anthracyclines s'intègre dans la compréhension des mécanismes d'induction de la mort cellulaire. Différentes voies sont possibles en fonction de la dose et de la durée de contact des anthracyclines.

Une des conséquences du traitement avec des anthracyclines est l'induction de l'apoptose. Cette voie a été clairement mise en évidence au cours d'expérimentations *in vitro* sur différents modèles cellulaires, répertoriées dans la revue de *Gewirtz*, avec la doxorubicine ou la daunorubicine pour une gamme de concentrations entre 0,5 et 1  $\mu$ M (Gewirtz, 1999). Une autre alternative est associée au traitement par anthracycline, elle est représentée par la transduction de signaux provoquant un arrêt du cycle. Deux possibilités d'arrêt sont relevées dans cette revue, classiquement un arrêt en G<sub>2</sub>, et issus de travaux récents un arrêt en G<sub>1</sub> (Gewirtz, 1999). L'application de dose supraclinique (supérieure à 5  $\mu$ M) et/ou de longue durée d'exposition (72 ou 96 h) implique un processus de nécrose cellulaire (Gewirtz, 1999). L'état des connaissances sur ces différents points sera développé dans le chapitre suivant.

#### 4. Indications thérapeutiques et toxicité

Le Tableau 1 illustre le large spectre d'activité anticancéreuse des anthracyclines.

Généralement les anthracyclines sont utilisées en association ou en relais avec d'autres agents chimiothérapeutiques comme par exemple, le 5-fluorouracile, le cyclophosphamide, le paclitaxel, la vincristine. La toxicité des composés utilisés en chimiothérapie est en général importante. En effet, les substances antimitotiques agissent préférentiellement sur les cellules à division rapide. Ce type de cellule peut être cancéreux, ce qui correspond à l'indication thérapeutique, ou non et dans ce cas la toxicité et les effets secondaires se manifestent. Les effets secondaires rencontrés peuvent être identifiés comme communs aux agents antimitotiques, ou spécifiques à cette famille d'anticancéreux (Prat et al., 1994).

- Les effets secondaires divers : alopécie, toxicité hématologique (leuco- et thrombocytopénie), troubles digestifs, immunodépression.

- Les effets secondaires spécifiques aux anthracyclines : toxicité rénale et cardiaque.

La toxicité cardiaque est cumulative et liée à la dose avec une dose totale maximum tolérée de 550 mg/m<sup>2</sup> pour la doxorubicine et de 900 mg/m<sup>2</sup> pour la daunorubicine (Prat et al., 1994). Afin de réduire ces toxicités cardiaques majeures, différentes stratégies thérapeutiques ont été employées. L'utilisation d'anthracyclines moins cardiotoxiques, a été favorisée comme l'épirubicine ou l'idarubicine (Muggia et Green, 1991). L'optimisation des protocoles thérapeutiques a permis de déterminer les paramètres à considérer tels que les voies (intraveineuse ou intrapéritonéale : standard, intra-artérielle ou -vésicale : loco-régionale), et les schémas d'administration (dose, fréquence et durée de la perfusion).

Type de cancer	
Leucémie aiguë et chronique	
Sein	
Poumon (petites cellules)	
Lymphomes	
Myélome	
Neuroblastome	
Sarcome des os et des parties molles	
Tumeur de Wilms	
Cellules germinales (ovaires et testicules)	
Ovaires (épithéliales)	
Vessie (cellules transitoires)	
Estomac	
Tête et cou	
Prostate	
Thyroïde	
Vessie (cellules squamées)	
Système nerveux central	
Colon	
Œsophage	
Mélanome	
Pancréas	
Cellules rénales	

Tableau 1 : Indications thérapeutiques des anthracyclines (Booser et Hortorbagyi, 1994).

Enfin des cardioprotecteurs peuvent également être associés aux traitements. Ceux-ci sont soit des inhibiteurs de radicaux libres (ex :  $\alpha$ -tocophérol) peu efficaces, ou plutôt des chélateurs de fer (ex : dexrazozane) inhibant la production de radicaux libres sans inhiber l'effet antitumoral des anthracyclines (Prat et al., 1994).

# RESUME DU CHAPITRE I

Malgré 30 années d'expérimentation et d'utilisation clinique, les mécanismes d'action des anthracyclines classiques et de structures dérivées ne sont pas maîtrisés.

Parmi les différentes hypothèses en cours, l'inhibition de la **topoisomérase II** par formation de complexe transitoire avec l'ADN reste une voie consensuelle même si la structure des anthracyclines implique un potentiel d'inhibition, et donc des **lésions de l'ADN**, différent. La production de **radicaux libres** est toujours un centre d'intérêt afin de déterminer leur rôle dans l'effet antitumoral par traitement aux anthracyclines. Enfin, la production de **céramide** présente un caractère novateur dans l'étude des anthracyclines. Cependant les données restent actuellement limitées aussi bien en fonction de la structure des anthracyclines que du modèle cellulaire (en suspension *vs* adhérent). En outre il semble que le mécanisme d'activation de la production de céramide soit encore sujet à controverse ainsi que les voies de signalisation associées.

Le développement de molécules dérivées d'anthracyclines classiques a mis en évidence que le caractère **lipophile** d'une part augmentait **l'influx** par modification des interactions "anthracycline-lipide", d'autre-part modifiait la **distribution** intracellulaire en étendant ses sites nucléaires à des sites cytoplasmiques. L'**idarubicine** est un candidat potentiel d'intérêt pour l'étude de l'impact de l'augmentation du caractère lipophile sur le mécanisme d'action cellulaire, tout en restant proche de l'application clinique.

La compréhension des mécanismes d'action cellulaire permet de mieux élucider les voies d'induction de la mort cellulaire par les anthracyclines.

#### **II LA RESISTANCE AUX ANTHRACYCLINES**

#### 1. Présentation générale

Le concept de résistance en oncologie s'applique aussi bien en chimiothérapie qu'en hormonoou radiothérapie. Les mécanismes de résistance peuvent être soit intrinsèques, c'est-à-dire au préalable à tout traitement de la tumeur, soit acquis c'est-à-dire exprimés après le traitement. A ce jour, certains mécanismes de résistance à la chimiothérapie ont été identifiés à différents niveaux, anatomophysiologique, cellulaire et/ou moléculaire. La plupart de ces hypothèses sont issues de recherches menées *in vitro* par le développement de lignées cellulaires présentant un phénotype de résistance, mais leurs rôles en clinique restent encore controversés. Il est possible de distinguer la résistance cellulaire spécifique et pléïotropique par les caractéristiques suivantes :

✓ Résistance cellulaire spécifique : altération du transport spécifique, modification du métabolisme des médicaments, altération des cibles intracellulaires.

✓ Résistance pléiotropique : modification de l'expression des gènes et protéines, activation des mécanismes de réparation et de détoxification, résistance liée aux protéines de transport

Nous nous attacherons à développer particulièrement dans ce chapitre les mécanismes de résistance pléiotropique. Le caractère pléiotrope traduit le fait que la résistance peut s'exercer simultanément vis-à-vis de plusieurs médicaments, et que plusieurs mécanismes peuvent d'ailleurs contribuer au développement de ce phénotype. Les médicaments impliqués font en général partie de la classe des agents d'origine naturelle comprenant divers composés comme. les anthracyclines, l'actinomycine D. l'étoposide, les vincaalcaloïdes. les épipodophyllotoxines, et les taxanes. On peut distinguer schématiquement trois types de résistance : la multidrug resistance (MDR) classique (associée aux protéines de transport), la MDR associée aux topoisomérases et celle associée au système du glutathion (associées aux mécanismes de réparation et de détoxification).

#### 2. Activation des mécanismes de réparation et de détoxification

Dans la résistance pléiotropique, seuls les mécanismes associés aux topoisomérases et au glutathion seront présentés selon diverses revues dans les deux paragraphes suivants.

#### 2.1. Résistance associée aux topoisomérases

Plusieurs médicaments interagissent avec la topoisomérase II par intercalation, et/ou stabilisation des complexes clivables, et/ou inhibition de l'activité catalytique (*Tableau 2*) (Isaacs et al., 1995).

1000000 = 10000000000000000000000000000	Tableau 2 : Effets d'agents chimiothér	apeutiques sur la topoisomérase	II (Isaacs et al., 19	95).
---	--	---------------------------------	-----------------------	------

Médicaments	Intercalation	Stabilisation des complexes	Inhibition de l'activité catalytique
Anthracyclines	7		
Amsacrines	1	1	
Etoposides (VP 16)		1	
Epipodophyllotoxines		1	$\checkmark$
ICRF-159/193			1
Suramine			$\checkmark$

Les modifications de cette cible commune à plusieurs anticancéreux peuvent avoir pour résultat une résistance croisée à ces médicaments, appelée AT-MDR (AT désignant altération de la topoisomérase II) (Booser et Hortorbagyi, 1994). Ces altérations se manifestent par des mutations des gènes qui entraînent des modifications quantitatives et qualitatives.

> Les niveaux d'expression des isoformes des topoisomérases II présentent d'importantes variations dans les tissus sains et tumoraux. Les études sur lignées cellulaires ont montré qu'un haut niveau d'expression de l'isoforme  $\alpha$  conférerait une sensibilité accrue à des agents comme la doxorubicine ou l'étoposide, et serait un marqueur de prolifération (Booser et Hortorbagyi, 1994). Cependant les études cliniques ne reproduisent pas clairement la même corrélation, excepté peut-être pour les tumeurs broncho-pulmonaires (Booser et Hortorbagyi, 1994) ou pour les cancers du sein (Isaacs et al., 1995).

> La phosphorylation contribue à l'activité enzymatique (Isaacs et al., 1995). L'analyse sur échantillons tumoraux a montré que l'augmentation de l'activité en topoisomérase II désignerait des tumeurs prolifératives et agressives (Booser et Hortorbagyi, 1994, Isaacs et al., 1995). Sur lignée cellulaire une hypophosphorylation induirait une réduction de l'activité enzymatique.

2.2. Résistance associée au glutathion (GSH) et aux enzymes associées (GSTs)

Selon la revue de *Tew* le glutathion et les glutathion-S-transférases sont responsables de la métabolisation et de la détoxification des agents nocifs pour la cellule (Tew, 1994).

> Le glutathion (GSH) est un tripeptide ( $\gamma$ -glutamylcystéine-glycine) qui sert de nucléophile dans de nombreuses réactions de détoxification. Le maintien du taux intracellulaire constant (0.1-10 mM) s'effectue par une synthèse *de novo* et un système de réparation (*Figure 5*).



Figure 5: Voies de synthèse (....) et de sauvegarde du glutathion (\_\_\_\_) (Tew, 1994).

Ce taux est impliqué dans la résistance aux radiations ionisantes et aux agents anticancéreux comme les alkylants (melphalan, cis-platine) ou les anthracyclines. En effet, un taux important en GSH permet à la cellule de neutraliser les molécules toxiques (Tew, 1994).

> Les glutathion S-transférases (GSTs) sont une famille d'iso-enzymes comprenant les GST- $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  et  $\theta$ . Elles sont codées par 5 gènes dont 4 pour les formes cytosoliques et un pour la forme microsomale ( $\theta$ ). Elles catalysent l'addition nucléophile du thiol réduit du GSH sur un composé électrophile. La faible spécificité des GSTs leur permet de reconnaître plusieurs fonctions chimiques avec peu d'affinité. L'augmentation et/ou l'expression différentielle des GSTs dans la résistance aux anticancéreux a souvent été signalée. En effet dans les tumeurs, comparées aux tissus sains adjacents, les taux de GSTs augmentent souvent comme la GST- $\pi$  dans les carcinomes colorectaux, les tumeurs de l'estomac, des poumons ou encore de la vessie. Chaque iso-enzyme de la GST est associée à un type de résistance. Ainsi, les GST- $\alpha$  et  $\mu$  sont liées aux agents alkylants, en particulier les nitrosourées, et l'iso-enzyme  $\pi$  est associée aux mécanismes de résistance aux anthracyclines par conjugaison des radicaux quinones qui génèrent un stress oxydatif membranaire ou nucléaire (Tew, 1994).
# 3. La résistance associée aux protéines de transport

Le phénotype de résistance implique une résistance croisée à divers composés d'origine naturelle en altérant, par des protéines trans-membranaires, la concentration intracellulaire d'agent antitumoral et/ou leur distribution subcellulaire.

#### 3.1. Les différentes classes de transporteurs

### 3.1.1. Les transporteurs appartenant aux ATP-binding-cassette protéines

La superfamille des *ATP-binding-cassette* protéines (ABC protéines) sont des protéines transmembranaires de transport existant chez les procaryotes et eucaryotes. Elles sont impliquées dans la translocation contre un gradient de concentration et ATP-dépendant d'un large panel de substrats tels que les ions, les métaux, les peptides, les hormones stéroïdes, les phospholipides et les médicaments. Leurs principales caractéristiques structurales consistent en 4 domaines, 2 domaines intégrés dans la membrane et 2 domaines cytoplasmiques. Ces derniers comportent des motifs conservés, les *nucleotides binding domains* (NBDs). Parmi les protéines de transport associées à la résistance pléiotropique, nombreuses appartiennent à cette superfamille. La première à avoir été décrite est la glycoprotéine-P (P-gp) (Endicot et Ling, 1989), puis la *multidrug resistance related protein* (MRP) (Cole et al., 1992), ou encore la protéine *anthracycline resistance associated* (ARA) (Longhurst et al., 1996).

## 3.1.2. Les transporteurs n'appartenant pas aux ATP-binding-cassette protéines

Outre les ABC protéines, d'autres mécanismes ont été mis en évidence dans des systèmes expérimentaux qui confèrent un phénotype de résistance par le transport des anticancéreux. Une protéine surexprimée a été découverte dans une lignée cellulaire pulmonaire présentant un phénotype MDR sans expression de P-gp et appelée *lung resistance related protein* (LRP) (Scheper et al., 1993). Cette protéine LRP de 110 kDa a été identifiée comme appartenant à la famille des protéines humaines majeures voûtées. La LRP est codée par le gène lrp situé sur le chromosome 16, bande p11.2. La LRP est une ribonucléoprotéine de structure cylindrique largement distribuée dans le cytoplasme. En outre, elle est très présente à proximité des pores de la membrane nucléaire, suggérant un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique. Elle pourrait ainsi protéger le noyau des xénobiotiques (dont les anthracyclines). La structure très conservée de cette protéine laisse présager un rôle important dans les tissus humains sains ou cancéreux, et donc dans la résistance aux médicaments (Izquierdo et al., 1996).

3.2. Aspect moléculaire, structural et fonctionnel de la glycoprotéine-P et de la *multidrug resistance related protein* 

## 3.2.1. La glycoprotéine-P

### Les gènes mdr

*Nomenclature*. Cette famille de gènes a été identifiée dans différentes espèces et présente une conservation de séquence traduisant un rôle essentiel au cours de l'évolution. Ils ont été classés selon qu'ils induisent ou non un phénotype de résistance. Ainsi les gènes de classe I et II induisent le phénotype MDR classique, alors que les gènes de classe III n'induisent pas de résistance (*Tableau 3*).

Tableau 3 : Classes des gènes mdr (Skovsgaard et al., 1994).

Lance Classe et II		Classe III
Hamster pgp1, pgp2		pgp3
Souris mdr3 (mdr1a), mdi	r1 (mdr1b)	mdr2
Homme mdr1		mdr2 (mdr3)

Régulation de l'expression du gène mdr1. Les gènes mdr humains sont adjacents et localisés sur la région chromosomique 7q21-31 (Bell et al., 1987). Au cours du développement du phénotype MDR, l'activation transcriptionnelle du gène mdr1 précède son amplification. Les lignées cellulaires de phénotype MDR, induit par des médicaments telles que les anthracyclines, surexpriment la P-gp par activation de la transcription et/ou de la traduction. Cependant des lignées à haut niveau de résistance ont été décrites avec une amplification génique impliquant soit les chromosomes doubles-minutes (DMC), soit les régions marquées de façon homogène (homogeneously stained regions ; HSR) (Endicot et Ling, 1989). Il semblerait que les modèles avec activation de la transcription et/ou de la traduction, particulièrement ceux à faible niveau de résistance, traduiraient mieux la réalité clinique (Rohlff et Glazer, 1995). Le gène mdr1 humain contient deux sites majeurs d'initiation de transcription au niveau de l'exon 1a en amont du site ATG produisant un ARN messager de 4,5 kb. La régulation de l'expression de mdr1 s'effectue par l'intermédiaire d'un promoteur contenant une séquence consensus CAAT box, mais pas de TATA box ainsi que des éléments de contrôle comme les séquences consensus Y-box au niveau de l'exon et de l'intron 1. Parmi les voies d'activation de transcription décrites, deux voies majeures de transactivation interagissent : la voie hormonodépendante, via l'AMP-cyclique (AMP-c) et la protéine kinase A (PKA), et la voie dépendante des facteurs de croissance EGF. La voie AMP-c/PKA active

des facteurs répondant à l'AMP-c (CRFs) comme, AP-1 et 2, SP1 et CREB (se lie à la séquence CRE) qui exercent une régulation positive sur mdr1. La voie EGF implique l'activation de facteurs de transcription comme C/EBP (se lie à la séquence CCAAT) et d'AP-1 qui activent l'expression de mdr1. Ces éléments sont présentés dans la *Figure 6* selon la revue de *Rohlff et al.* 



Figure 6 : Représentation schématique des éléments de régulation de mdr1. Le promoteur inclut entre autres la séquence CCAAT, les séquences de la protéine activatrice 1 (AP-1) et des éléments répondants à l'AMP-c (CRE). Les éléments de contrôle au niveau de l'exon1 comprennent la séquence Y-box ainsi que de l'AP-2 et de SP1 (Rohlff et Glazer, 1995).

# La glycoprotéine-P (P-gp)

*Structure*. La P-gp est une protéine de 1280 acides-aminés. Le poids moléculaire de la protéine mature est de 170 kDa (Endicot et Ling, 1989). Cette protéine est organisée en un tandem dupliqué homologue, comprenant chacun un domaine hydrophobe trans-membranaire et un domaine hydrophile intracellulaire. Chaque domaine hydrophobe est constitué de 6 hélices trans-membranaires. Chaque domaine hydrophile, appelé *nucleotide-binding domain* (*NBD*), permet la liaison d'une ATP. Les deux moitiés analogues de la P-gp sont séparées par un domaine phosphorylable : la région *linker*. En outre, la première boucle extracellulaire en N-terminale est le siège de glycosylation (*Figure 7*).



Figure 7 : Modèle de structure de la P-gp et de son orientation à travers la membrane cytoplasmique (Gottesman, 1993).

Modification de la protéine. Le poids moléculaire de la P-gp mature (170 kDa) résulte de modifications post-traductionnelles. La glycosylation en N-terminale n'est pas nécessaire pour

l'acquisition du phénotype MDR. Par contre, il semble que la phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) soit impliquée dans la fonction de la P-gp (Endicot et Ling, 1989).

*Substrats.* Les substrats de la P-gp ont des propriétés physiques communes. Ce sont des composés amphiphiles (relativement hydrophobes) et cationiques. Concernant la charge, il ne s'agit pas d'une règle absolue puisque des molécules neutres (épipodophyllotoxines, paclitaxel) et chargées positivement (anthracyclines, *vinca*alcaloïdes) à pH physiologique sont des substrats de la P-gp. Toutefois, il semblerait que les composés anioniques aient peu d'affinité pour la P-gp. Outre ses cibles de prédilection (*vinca*alcaloïdes, anthracyclines, colchicine, epipodophyllotoxines, taxanes, stéroïdes...), la P-gp participe aux échanges d'ions Cl<sup>-</sup> traduisant son homologie avec la *CFTR* (Gottesman, 1993).

# 3.2.2. La multidrug resistance related protein

### Les gènes mrp

*Nomenclature*. Le gène mrp1 se situe sur la région chromosomique 16p13.1 (Cole et al., 1992), mais plusieurs homologues ont été identifiés sur des chromosomes différents. Ces gènes produisent des protéines très proches de la MRP et appartiennent aux ABC protéines. Cependant ils comportent des différences aussi bien au niveau de leur expression que de la structure et des substrats associés à la protéine. Parmi eux un nouveau gène associé au phénotype MDR a été identifié, dont la protéine présente des similarités avec la MRP. Ce gène associé à la résistance aux anthracyclines (ara) produit un transcrit de 2,2 kb. Il a été décrit *in vitro* dans une lignée MDR sélectionnée par une anthracycline CCRF-CEM/E1000 surexprimant la mrp1 (Longhurst et al., 1996).

*Régulation de l'expression du gène mrp1*. Le mécanisme d'apparition du phénotype MDR impliquant la MRP ne semble pas encore clairement déterminé. Fréquemment, les lignées humaines cellulaires MDR sélectionnées par des anticancéreux présentent un taux constitutif de l'ARNm de MRP. Des amplifications géniques ont été relevées dans divers modèles cellulaires humains soit par le biais de DMC, soit par les HSRs. Cependant, il est possible que des mutations d'éléments de régulation *cis* ou de facteurs de transactivation augmentent la transcription de mrp1. A ce jour, il existe peu de certitudes concernant le procédé de régulation de transcription de mrp1 ou de la dégradation de son ARNm. Le promoteur du gène mrp1 humain, en amont de la séquence de l'ARN messager de 6.5 kb, contient des séquences riches en G-C. Ces séquences répétées sont caractéristiques des promoteurs qui n'ont ni de

séquence consensus *CAAT box*, ni de *TATA box*. Parmi les voies de régulation par transactivation, il semblerait que le facteur Sp1 soit impliqué dans la détermination du niveau basal d'expression du gène ou dans la modulation de son activité en réponse à différents stimuli (Loe et al., 1996).

# La multidrug resistance related protein (MRP)

Structure. La MRP est une protéine de 1531 acides-aminés de poids moléculaire à maturation de 190 kDa. Cependant, elle ne présente que 15% d'identité en acides-aminés avec la P-gp. La structure secondaire de la MRP se distingue de celle proposée pour la P-gp (Almquist et al., 1995, Cole et al., 1992). Parmi les hypothèses de topologie de la MRP, deux modèles sont présentés dans la *Figure 8*. La structure (a) contient 8 domaines trans-membranaires dans la première moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule et 4 dans la seconde moitié COOH-terminale. Les deux domaines trans-membranaires sont *N*-glycosylés, et la région phosphorylable sépare les deux moitiés par la région *linker* à proximité du domaine NBD1. La structure (b) contient 11 à 12 segments trans-membranaires dans la première moitié COOH-terminale. Comme le premier modèle, les deux domaines trans-membranaires dans la première moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule et 0 dans la seconde moitié COOH-terminale. Comme le premier modèle, les deux domaines trans-membranaires dans la première moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule et 6 dans la seconde moitié COOH-terminale. Comme le premier modèle, les deux domaines trans-membranaires dans la première phosphorylable est à proximité du domaine NBD1. Quoiqu'il en soit, la MRP se différencie de la P-gp également par la divergence de séquence primaire entre les domaines NBD1 et 2.



Figure 8 : Deux modèles de structure de la MRP et de son orientation à travers la membrane cytoplasmique (Loe et al., 1996).

Modification de la protéine. Les N-glycosylations ainsi que les phosphorylations résultent de modifications post-traductionnelles. La nature complexe des oligosaccharides insérés lors des N-glycosylations implique une localisation et un procédé de maturation spécifique. La nature des kinases impliquées dans les phosphorylations n'est pas déterminée, même s'il semble que

les PKC interviennent. Aucune de ces modifications n'a été encore démontrée comme essentielle à la fonction de la MRP (Almquist et al., 1995).

*Substrats.* Le spectre des substrats de la MRP est très proche de celui attribué aux transporteurs multispécifiques d'anions organiques (MOAT) appartenant aux ABC protéines, suggérant le transport de peptides farnésylés. En outre, la MRP transporte des conjugués au glutathion, tel que le leucotriène cystéinyle 4 (LTC<sub>4</sub>) ainsi que des anticancéreux conjugués ou non : alkylants, nitrosourés, anthracyclines, étoposide, *vinca*alcaloïdes. Par contre, la MRP a peu d'affinité pour le paclitaxel et la colchicine (Loe et al., 1996).

# 3.3. Mécanismes d'action de la P-gp et de la MRP

Le phénotype MDR classique implique pour les anthracyclines une diminution de leur concentration intracellulaire. Ce phénomène traduit un efflux actif des anthracyclines hors de la cellule associé ou non à une altération de leur distribution subcellulaire par séquestration cytoplasmique. Malgré leur appartenance commune aux ABC-protéines, la P-gp et la MRP ont des caractéristiques divergentes impliquant *a priori* un mode d'action différent.

## 3.3.1. Défaut d'accumulation

La diminution de la concentration cellulaire des anthracyclines dépend de leur influx et efflux à travers la membrane.

Concernant le mécanisme d'action de la P-gp, un modèle basé sur les données biochimiques et de structure-fonction a été proposé. Le mode d'extrusion des anticancéreux hors de la cellule consisterait en une prise en charge dans un premier temps au niveau de la membrane cytoplasmique avant leur diffusion, ainsi que secondairement par un efflux actif des molécules à partir du cytosol (Gottesman, 1993). La revue de *Garnier-Suillerot* analyse les paramètres de transport (influx, efflux) pour les anthracyclines et les *vinca*alkaloïdes. Elle rappelle plusieurs corrélations : i) le niveau d'expression de P-gp est corrélé avec le degré de résistance aux anthracyclines, ii) l'accumulation intracellulaire d'anthracyclines est corrélée avec leur cytotoxicité pour l'analyse du phénotype MDR classique (courte et longue exposition). Les paramètres issus des cinétiques de transport sont particulièrement prédictifs de l'efficacité cytotoxique des anthracyclines, en particulier le coefficient moyen d'influx ( $k_+$ ) par rapport au coefficient d'efflux actif ( $k_a$ ) ou de dissociation ( $K_m$ ) de la P-gp moins dépendant de la structure des molécules. Pour une anthracycline donnée, le caractère prépondérant est sa lipophilie qui augmente directement la cinétique d'influx et diminue le facteur de résistance. L'idarubicine, l'aclacinomycine ou l'hydroxyrubicine illustrent particulièrement ce phénomène (Garnier-Suillerot, 1995).

Le modèle associé à la P-gp peut-être appliqué à la MRP concernant le mécanisme d'efflux actif des molécules neutres hydrophobes. Cependant le phénotype induit par la surexpression de la MRP est moins précisément établi que pour la P-gp. La diminution de l'accumulation des anticancéreux n'est pas systématiquement mise en évidence comme pour le modèle H69AR surexprimant la MRP et sélectionné par la doxorubicine (Cole et al., 1991). La complexité d'interprétation des données pharmacologiques provient d'une part du mécanisme d'efflux des composés hydrophobes anioniques (calcéine) ou cationiques (daunorubicine) puisque vraisemblablement conjugués au glutathion selon des processus spécifiques (Hollo et al., 1996, Versantvoort et al., 1995), d'autre part de l'intervention d'un phénomène d'altération de distribution par séquestration cytoplasmique.

### 3.3.2. Altération de la distribution subcellulaire

La séquestration cytoplasmique consiste en un "emprisonnement" des anthracyclines au niveau d'organites cytoplasmiques par le biais de protéines de transport dont l'orientation serait inverse à celle définie au niveau des membranes cytoplasmiques.

Cet événement a fréquemment été observé avec la daunorubicine ou la doxorubicine au sein des lignées surexprimant la MRP, issues de la sélection par des anticancéreux comme les HL60/ADR (Hindenburg et al., 1989), SW1573-2R (Schuurhuis et al., 1991) ou CORL23R (Coley et al., 1993). Ce mécanisme implique une localisation fonctionnelle de la protéine au niveau membranaire d'un organite. La MRP est localisée au niveau de la membrane cytoplasmique quelle que soit l'origine du modèle (transfecté ou sélectionné). Par contre, sa localisation ainsi que sa proportion cytoplasmique semblent dépendre du modèle. Les modèles transfectés ont une MRP plutôt dans la région golgienne selon une faible proportion, alors que les modèles sélectionnés ont une MRP au niveau du réticulum endoplasmique selon une densité plus importante (Almquist et al., 1995, Flens et al., 1994). La séquestration pourrait expliquer les résultats surprenants de ce phénotype de résistance aux anthracyclines en termes de faible réduction d'accumulation et/ou de cinétique d'efflux puisque ce mécanisme implique moins d'agent antitumoral libre à effluer au niveau du cytosol.

La P-gp a été décrite au niveau de la membrane cytoplasmique et au niveau des membranes cytoplasmiques et/ou nucléaires (Dalton et al., 1989, Shapiro et al., 1998). Si la séquestration cytoplasmique a été observée dans différentes lignées sélectionnées (Bennis et al., 1995,

Gervasoni et al., 1991, Merlin et al., 1995 b), sa localisation et l'importance de son implication dans le phénotype de résistance aux anthracyclines restent à déterminer.

## 4. La modulation de la résistance

Parmi les voies de recherche sur la résistance la réversion du phénotype MDR est celle qui comportait, outre des outils méthodologiques de compréhension fondamentale, des espoirs pour circonvenir la chimiorésistance en clinique. De nombreux travaux ont été réalisés afin d'identifier des inhibiteurs de protéines de transport MDR. Ils peuvent affecter la fonction de transport en se liant directement aux protéines. Mais l'indication de mode d'action par inhibition compétitive ou non est rendue complexe au vu des nombreux sites de liaison des médicaments. En outre, ces composés peuvent agir indirectement sur ces protéines comme par altération de la structure des membranes cytoplasmiques, inhibition des PKCs, déplétion de glutathion (GSH). Enfin, leur mode d'action peut être une combinaison d'action directe et indirecte.

# 4.1. Spécificité d'action

# La P-glycoprotéine (P-gp)

Les modulateurs, ou réversant de la P-gp appartiennent à différentes catégories de familles : les inhibiteurs de canaux calciques (ex : vérapamil, VRP), les antagonistes de calmoduline (ex : trifluoperazine, TFP), les agents stéroïdes (ex : tamoxifène, TAM), les agents immunosuppresseurs (ex : cyclosporine A, CSA) et leurs analogues non-immunosuppresseurs (ex : PSC-833). Ces composés ont des similarités de structure comprenant : un hétérocycle, une charge positive à pH physiologique, un caractère lipophile (Ford et Hait, 1993).

# La multidrug resistance related protein (MRP)

Parmi les modulateurs de la MRP communs à la P-gp, on retrouve le vérapamil, le tamoxifène, la cyclosporine A et le PSC-833 mais selon des efficacité inhibitrices différentes, voire inverses (ex : VRP et CSA) (Hollo et al., 1996). Parmi les modulateurs spécifiques à la MRP, la buthionine sulfoxime (BSO) un inhibiteur réversible du taux intracellulaire du GSH, le probénécide (PBC) un inhibiteur des transporteurs de composés anioniques (Hollo et al., 1996).

### 4.2. Applications

Le premier intérêt des modulateurs consiste en la compréhension des mécanismes de transport des anthracyclines. De ces travaux ont émergé la mise au point de méthodes *in vitro* et/ou *in vivo*, évaluant le caractère fonctionnel des pompes à efflux (Barbarics et al., 1998, Merlin et al., 1994) ou permettant de discerner la P-gp de la MRP (Feller et al., 1995).

Toutefois des espoirs portés sur la modulation pharmacologique en clinique, peu se sont avérés concluants. De nombreux modulateurs efficaces *in vitro* se sont révélés peu efficaces dans les essais cliniques, voire toxiques en modifiant le métabolisme des médicaments (Terret et al., 1996). Le PSC-833 (Valspodar) semble rester un candidat potentiel dans la réversion du phénotype MDR. Les expérimentations *in vitro* ont déterminé que le PSC-833 se lie à la P-gp et qu'il inhibe sa fonction de transport, par voie directe (Archinal-Mattheis et al., 1995, Smith et al., 1998), et/ou par inhibition de sa propriété ATPasique (Watanabe et al., 1997). Cependant son activité inhibitrice est moins efficace dans les conditions *in vivo* (Smith et al., 1998). Malgré tout, sa capacité de réversion du phénotype MDR a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* sur des cellules en suspension (Boesch et al., 1991, Jiang et al., 1995) et adhérentes (Barbarics et al., 1998, Hwang et al., 1996). Par ailleurs, des essais en phase clinique ont été principalement réalisés en oncohématologie (List, 1996). Les récents résultats de potentialisation de protocole standard de chimiothérapie sont encourageants (Advani et al., 1999, Tidefelt et al., 2000).

## 5. Applications en clinique

Les gènes associés au phénotype MDR ont été identifiés et caractérisés dans des systèmes expérimentaux, et leur rôle dans la résistance aux anticancéreux a été confirmé par des techniques de transfert de gènes. Par conséquent, il est nécessaire d'évaluer si les mécanismes MDR, en particulier les protéines de transport, présentent un intérêt clinique dans la réponse à la chimiothérapie, et plus précisément aux anthracyclines.

# 5.1. Les techniques de détection des gènes et protéines

L'évaluation sur des échantillons issus de prélèvements cliniques nécessite de considérer différents paramètres pour la détermination du phénotype MDR.

- L'expression du phénotype MDR dépend du niveau d'expression du gène, plutôt que d'une mutation spécifique de son gène. Les techniques devraient être au moins semi-quantitatives

- L'hétérogénéité des niveaux d'expression provient des différences entre population de patients issus de différents critères de sélection. En outre, les niveaux d'expression attendus sont inférieurs à ceux mesurés dans les systèmes expérimentaux. Par conséquent, les techniques devraient être hautement sensibles et spécifiques.

- Les méthodes devraient pouvoir différencier l'expression dans les tissus sains et tumoraux.

- L'utilisation de tests fonctionnels associés à l'évaluation de l'expression protéique serait complémentaire et idéale, que ce soit sur prélèvement de tumeurs solides ou de leucémie.

# 5.2. Les facteurs prédictifs en chimiothérapie

L'évaluation de l'expression sur tissus sains a été effectuée pour les cibles mdr1/Pgp et mrp1/MRP. Leurs principales localisations sont résumées dans le *Tableau 4*. Ces localisations ont permis d'envisager un rôle physiologique commun de protection contre les xénobiotiques mais qui implique différents substrats et mécanismes d'action.

Tableau 4 · Localisation	nrincinale	es de l'expres	sion de mdr	1 et mm1	dans les	a tissue sains
Tableau 4 . Localisations	principaic	es de l'expres	sion de mai	ւշւսախո	uans ici	s lissus sailis.

mdr1 (Goldstein et al., 1992)		mrp1 (Nooter et al., 1995)		
Niveau détectable	Faible niveau	Niveau détectable		
Rein, surrénales	Rein, ovaire, sein	Poumon, œsophage		
Colon, foie, pancréas	Foie, pancréas	Colon		
CD34	Glandes salivaires	Vessie, testicules, surrénales		
Lymphocytes périphériques		Lymphocytes périphériques		
Endothélium de capillaire		Granulocytes, monocytes,		
des testicules et cerveau		Rate		
		Muscle strié		
	stein et al., 1992) <u>Niveau détectable</u> Rein, surrénales Colon, foie, pancréas CD34 Lymphocytes périphériques Endothélium de capillaire des testicules et cerveau	stein et al., 1992)mrp1 (NoNiveau détectableFaible niveauRein, surrénalesRein, ovaire, seinColon, foie, pancréasFoie, pancréasCD34Glandes salivairesLymphocytes périphériquesEndothélium de capillairedes testicules et cerveauImage: State Sta		

Les tissus tumoraux peuvent exprimer un gène et/ou sa protéine au niveau de tumeurs non traitées, correspondant souvent aux localisations des tissus sains, ou au niveau de tumeurs traitées. Le *Tableau 5* récapitule les données pour mdr1 et mrp1 issues de différents travaux.

Tableau 5 : Localisations principales de l'expression de mdr1et mrp1 dans les tissus tumoraux.

mdr1 (Goldstein et al., 1992)		mrp1 (Loe et al., 1996, Nooter et al., 1995)		
Tumeurs non traitées <sup>a</sup>	Tumeurs traitées <sup>a</sup>	Tumeurs <sup>a</sup>		
Colon, foie, pancréas	Neuroblastome	Leucemie chronique		
Rein, surrénales	Sarcomes <sup>b</sup>	Poumon <sup>h</sup> , rate, vessie, surrénales		
Lymphomes, neuroblastome <sup>b</sup>	Ovaires, seins <sup>b</sup>	Leucemies aigues (LAM) <sup>b</sup>		
Leucémies aiguês, chroniques	Leucemies aigues <sup>b</sup>	Mélanome, neuroblastome		
Poumon <sup>b</sup> , cesophage	Myélome multiple h	Colon, rein, estomac		
Ovaires, seins <sup>b</sup>		Sarcomes, myélome multiple <sup>b</sup>		
Mélanome, estomac, vessie		Foie, pancréas, ovaires, seins		

<sup>a</sup> Présentation en fonction d'une expression du gène détecté selon un niveau décroissant

<sup>b</sup> Cancers présentant une indication pour les anthracyclines dans les protocoles standard de chimiothérapie

# > Les cancers d'origine hématologique

Les leucémies incluent différentes formes de pathologies cancéreuses hématologiques, telles que les leucémies lymphoblastiques et myéloblastiques aiguës (LAL, LAM) ou chroniques, les lymphomes, les neuroblastomes, les myélomes multiples. La chimiothérapie est largement employée dans ces cancers, et en particulier les anthracyclines. Malgré des résultats initiaux encourageants, les rechutes existent. Le phénotype classique MDR est le centre de nombreuses investigations cliniques d'abord pour la P-gp, et plus récemment pour la MRP et la LRP. Leur rôle potentiel respectif se distingue en fonction de pathologie pédiatrique ou adulte. Concernant les leucémies d'enfant, selon Dhooge et al. le taux d'expression de la P-gp dans les LAL semble être un paramètre pronostique défavorable (Dhooge et De Moerloose, 1999). Alors que selon Den Boer et al. la surexpression de la LRP, à la différence de la P-gp ou la MRP, est associée dans les LAL d'enfants à un défaut d'accumulation (Den Boer et al., 1999). Enfin dans les neuroblastomes d'enfants, la surexpression de MRP a été montrée comme un puissant facteur pronostique indépendant de faible réponse à la chimiothérapie (Bordow et al., 1994). Pour les adultes, il semble se détacher un constat consensuel sur l'intérêt clinique de la détermination dans les LAM de la P-gp (Guerci et al., 1995, Marie et Legrand, 1999, Michieli et al., 1997), de la LRP (List et al., 1996, Michieli et al., 1997), et dans une moindre mesure de la MRP (Nooter et al., 1996, Schneider et al., 1995).

Les tests fonctionnels, associant ou non des modulateurs (Merlin et al., 1994, Michieli et al., 1997), sont déterminants dans l'interprétation des taux relevés des différentes cibles. Ces tests sont basés sur une mesure de la variation intracellulaire des différents substrats tels que les anthracyclines (Guerci et al., 1995), la rhodamine 123 (Michieli et al., 1997), ou la calcéine-AM (Schuurhuis et al., 1995). Exceptées les observations de distribution intracellulaire sur prélèvements de LAM d'adulte effectués par *Lautier et al.* concernant 4 anthracyclines sur lignées et prélèvements (Lautier et al., 1997), et par *Schuurhuis et al.* pour la distribution de la doxorubicine (Schuurhuis et al., 1995), il n'y a pas de données cliniques sur le phénomène de séquestration impliquant l'une des trois protéines de transport majeur (P-gp, MRP, LRP).

### > Les tumeurs solides

Les cancers broncho-pulmonaires sont regroupés en deux catégories, les cancers bronchopulmonaires à petites cellules et non à petites cellules (CPC, CPNC) représentant respectivement 20 et 80% des cas recensés de tumeurs épithéliales pulmonaires. De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été employées incluant la chimiothérapie. Parmi les substances testées, peu sont efficaces comme le cyclophosphamide, l'ifosfamide, les anthracyclines, l'étoposide, la vincristine, et plus récemment, les taxanes et le topotécan. De façon générale, les CPC développeraient leur résistance après le traitement alors que les CNPC sont connus pour présenter d'emblée une résistance aux traitements (Clynes et al., 1993). L'implication de la mdr1/Pgp dans la réponse à la chimiothérapie est très controversée que ce soit pour les CPC ou les CNPC. Concernant la MRP, si plusieurs études ont montré sa surexpression dans les CPC (Campling et al., 1997) et les CNPC (Giaccone et al., 1996), sa corrélation avec son apparition en fonction du traitement, ou de son augmentation en fonction de l'évolution de la maladie et le taux de réponse au traitement reste à confirmer.

Les cancers du sein sont considérés comme l'un des cancers les plus chimiosensibles parmi les tumeurs solides. De nombreuses substances sont actives comme les anthracyclines, les alkylants, les antimétabolites, les alcaloïdes de pervenche, l'étoposide, le cis-platine et plus récemment les taxanes. Cependant si la réponse globale reste importante, la durée de réponse est relativement courte, et la plupart des tumeurs acquièrent un phénotype de résistance. L'implication du phénotype MDR reste discutée, mais les différents mécanismes retenus sont : l'expression de la P-gp, la MRP, des GST, et l'altération des topoisomérases. Concernant la Pgp, une méta-analyse de Trock et al. a été réalisée à partir de 31 études entre 1989 et 1996. Elle a mis en évidence que l'expression mdr1/P-gp dans les cancers du sein est associée à un pronostic de faible réponse à la chimiothérapie, en particulier à la doxorubicine, ainsi qu'à un caractère agressif de la tumeur (Trock et al., 1997). Le rôle de la MRP est également en cours d'évaluation dans cette pathologie. Les résultats de l'équipe de Nooter et al. sont issus d'une analyse de 259 prélèvements de cancers primaires du sein. La surexpression de la protéine MRP a été constatée dans 30% des patients et localisée principalement au niveau cytoplasmique, suggérant l'implication de mécanismes de séquestration rencontrés dans les lignées cellulaires. Si le statut de l'expression de MRP n'a pas été démontré en termes de pronostic, il est associé à un comportement tumoral plus agressif et à un phénotype de résistance (Nooter et al., 1997). L'utilisation de techniques très sensibles (RT-PCR, RNase protection assay) pour l'expression des gènes mdr1 et mrp1 a mis en évidence une expression de faible niveau ubiquitaire qui laisse présager une sélection des cellules exprimant ces gènes plutôt qu'une réelle induction par les traitements (Nooter et al., 1995, Wang et al., 1997).

La nature des échantillons issus de tumeurs solides rend moins aisée la réalisation des tests fonctionnels (accumulation, rétention, distribution d'anthracyclines) qui nécessitent soit une dissociation, soit une coupe préservant la viabilité des cellules et leurs fonctions.

# **RESUME DU CHAPITRE II**

La résistance pléiotropique comprend 3 aspects : la MDR classique, l'AT-MDR et la MDR associée au système du glutathion. Parmi les protéines de transport, la superfamille des ABC-protéines inclut deux des trois principales protéines impliquées dans le phénotype MDR classique, la P-glycoprotéine (**P-gp**) et la *multidrug resistance related protein* (**MRP**).

Etudiées depuis plus de 10 ans, les connaissances fondamentales à leur sujet sont conséquentes. La P-gp est le produit de l'expression du gène humain mdr1, et sa surexpression est induite par activation de sa transcription et/ou de sa traduction. La MRP est le produit de l'expression du gène humain mrp1, et les mécanismes régissant sa surexpression restent mal connus. La P-gp et la MRP sont des protéines trans-membranaires avec des spécificités structurales propres.

Le phénotype MDR classique se traduit pour les anthracyclines par un défaut d'accumulation intracellulaire et/ou une séquestration cytoplasmique. La diminution de la concentration cellulaire s'effectue par un efflux actif pour la P-gp et la MRP, mais selon un mécanisme et un panel de substrats spécifiques à chacune. L'influx s'est révélé un critère important pour le choix des anthracyclines dérivées à sélectionner. La séquestration cytoplasmique des anthracyclines est décrite plus précisément pour la MRP que la P-gp. Parmi les stratégies de réversion de la MDR l'utilisation de chimiomodulateur est une voie classique mais dont les résultats en clinique sont souvent décevants.

Concernant les **applications en clinique** de la MDR classique, de nombreuses études réalisées sur cette thématique ont mis en évidence son rôle dans les leucémies, alors que pour les tumeurs solides les résultats restent controversés. Les évaluations s'effectuent généralement sur le niveau d'expression des transcrits ou des protéines (mdr1/Pgp et mrp1/MRP), et quand cela est possible par des tests fonctionnels d'accumulation et/ou d'efflux. Par contre, actuellement, il n'existe pas de données sur l'implication de la séquestration cytoplasmique des anthracyclines en clinique.

# III LA REPONSE CELLULAIRE AUX ANTHRACYCLINES

La sensibilité ou la résistance aux anthracyclines est directement liée à la capacité des cellules tumorales à stopper leur division et à entrer dans un processus létal. Les arrêts du cycle cellulaire ou les voies aboutissant à la mort cellulaire sont sous le contrôle de médiateurs moléculaires qui sont progressivement activés.

# 1. Le cycle cellulaire

Les anthracyclines induisent des perturbations au niveau du cycle cellulaire. Chaque phase du cycle est associée à au moins un point de contrôle (*checkpoint*) qui autorise ou non le passage à la phase suivante.

1.1. Rappels : les phases du cycle

Le cycle cellulaire, d'une durée approximative de 24 heures (entre 10 et 40 heures), est une succession de phases de repos et de synthèse d'ADN. Il est composé de 4 phases :

- G<sub>1</sub> (gap 1) : les cellules à 2n chromosomes préparent la synthèse de l'ADN puis évaluent, en fin de G<sub>1</sub>, la possibilité de passer en phase S. La phase G<sub>1</sub> présente d'importantes variations de durée : d'une heure jusqu'à de très longues périodes.
- S (synthèse d'ADN) : l'ADN est répliqué. Ce processus dure environ 6 à 8 heures.
- G<sub>2</sub> (gap 2) : les cellules préparent la mitose pendant environ 4 heures puis évaluent, en fin de G<sub>2</sub>, la possibilité d'y entrer.
- M (mitose) : pendant une heure, les cellules se divisent. Elles comportent alors 4n chromosomes.

Deux possibilités s'offrent alors aux cellules, soit elles repassent en  $G_1$  et débutent un nouveau cycle, soit elles sortent du cycle et entrent dans un état quiescent appelé  $G_0$ . Ainsi les cellules d'un tissu ne sont pas toujours engagées dans un cycle bien qu'elles gardent leur capacité à se multiplier sous l'effet d'un stimulus pour sortir de cette phase  $G_0$ . Toutefois, aucun caractère biochimique ou morphologique ne permet de les distinguer des cellules en phase  $G_1$ ; par conséquent cette distinction n'est pas admise par tous.

#### 1.2. Contrôle de la division

#### 1.2.1. Régulation des phases du cycle

Toutes les étapes de la division cellulaire nécessitent des synthèses protéiques et donc l'activation de leur transcription au niveau de l'ADN. Un certain nombre de régulation sont dues à deux types de molécules : les cyclines et les *cyclin dependent kinases* d'une part, et d'autre part les facteurs de transcription.

#### 1.2.1.1. Les cyclines et les cyclin dependent kinases

La progression dans les différentes phases, est sous la dépendance de *cyclin dependent kinase* (Cdk) dont l'activité se met en place lors de la complexation avec des cyclines exprimées de manière transitoire lors du cycle cellulaire. Les différentes cyclines et Cdk identifiées se lient entre elles selon plusieurs combinaisons. Les complexes ainsi formés, qui s'expriment temporairement, régulent la progression du cycle cellulaire notamment au niveau des transitions G<sub>1</sub>/S et G<sub>2</sub>/M (Albert et al., 1995).

Il existe des inhibiteurs des Cdk représentés par deux principales familles. Ceux sont potentiellement des gènes suppresseurs de tumeurs. La famille CIP/KIP correspond à un ensemble de protéines inhibitrices des Cdk de la phase  $G_1$ , en particulier la protéine P21 synthétisée sous la dépendance du gène WAF<sub>1</sub>/CIP<sub>1</sub>. La famille INK4 inhibe la Cdk4 et inclut 3 protéines (P16, P15, P18) dont les rôles physiologiques ne sont pas encore clairement déterminés (Albert et al., 1995).

#### 1.2.1.2. Les facteurs de transcription

Il existe des interconnections entre les facteurs de transcription et la régulation du cycle cellulaire. Pour exemple, les facteurs de transcription  $E_2F$ , AP-1 et NF $\kappa$ -B régulent la transition  $G_1/S$  par activation de la transcription du gène de la cycline D1. La protéine P53 intervient dans de nombreux processus cellulaires. Dans la régulation du cycle cellulaire, elle a un rôle bivalent. Son mécanisme d'action est bien décrit dans le blocage du cycle cellulaire en  $G_1/S$ , par contre son rôle est moins bien défini dans l'arrêt en  $G_2/M$ .

# 1.2.2. Les points de contrôle

Entre les différentes étapes du cycle cellulaire se situent des points de contrôle qui ont pour but de vérifier l'intégrité de la transmission de l'ADN de la cellule mère vers les cellules filles. De par leur position stratégique, les arrêts en  $G_1/S$  et  $G_2/M$  sont les mieux connus. Il existe des mécanismes régulateurs positifs ou négatifs impliquant les voies de transmission du signal entre le milieu extracellulaire, la membrane cellulaire, le cytoplasme et les molécules nucléaires (*Figure 9*).



En [1], sous l'influence de facteurs de croissance, la cellule reçoit le signal de se diviser.

En [2], induction de la transmission du signal. En [3], les cellules sortent de  $G_0$  et progressent au delà d'un point de restriction [4] à la condition de recevoir un stimulus constant.

En [5], il existe un point de contrôle ne laissant se diviser que l'ADN normal.

En [6], la cellule double sa quantité d'ADN. En cas d'anomalie non réparable de l'ADN, elle évolue vers la mort [7].

En [8], il existe un nouveau point de contrôle avant la séparation du matériel génétique vers deux cellules filles.

En [9], la mitose s'accomplit. Les cellules se séparent et retournent en G0, sauf si un stimulus entretient le processus de division

Figure 9 : Les différentes étapes de contrôles au cours du cycle cellulaire selon le site internet http://www.baclesse.fr/cours/fondamentale/4-division-cellulaire/Divis-1.htm.

### 1.2.2.1. Le point de contrôle $G_l/S$

La cible principale de l'activité kinase des complexes Cdk-cycline est Rb. C'est une protéine de 105 kDa codée par le gène suppresseur de tumeur de susceptibilité au rétinoblastome. Elle permet un arrêt réversible du cycle en  $G_1$  (Horton et al., 1995). En début de phase  $G_1$ , Rb non phosphorylée, est liée au facteur de transcription E2F. Rb empêche donc la progression du cycle en phase S (Suzuki-Takahashi et al., 1995). La phosphorylation de Rb par Cdk2, Cdk4 et Cdk6 permet la libération de E2F. Celui-ci enclenche alors la transcription de gènes nécessaires à la synthèse de l'ADN en phase S, tels que la thymidine kinase, la dihydrofolate réductase ou l'ADN polymérase. En fin de phase S, le complexe Cdk2-cycline A phosphoryle E2F, qui perd alors son activité transcriptionnelle.

#### 1.2.2.2. Le point de contrôle $G_2/M$

Le système clé du passage en  $G_2/M$  est un complexe multiprotéique, le *MPF* (*Maturation Promoting Factor*), composé de p34<sup>edc2</sup> (homologue de Cdk1) et de la cycline B1. Cette transition nécessite l'activation de la kinase H1 (H1K) de Cdk1 qui est régulée par une série de phosphorylations de Cdk1 et par la synthèse de cycline B1.

Le taux de cycline B1, régulé aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel et de la stabilité de l'ARNm, est faible en  $G_0$  et  $G_1$  alors qu'il augmente pendant les phases  $G_2$  et M (Welch et Wang, 1992). La localisation cellulaire (cytoplasmique puis nucléaire en  $G_2/M$ ) de la cycline B1 contribue aussi à sa régulation (Toyoshima et al., 1998). Quant à la phosphorylation de Cdk1, elle débute par celle de la thréonine 161 par le complexe Cdk7-cycline H encore appelé *CAK* (*Cdk-Activating Kinase*). La liaison de Cdk1 à la cycline B1 s'effectue en même temps que les phosphorylations de la thréonine 14 et de la tyrosine 15, qui empêchent l'acquisition précoce de l'activité kinasique du complexe. L'activité enzymatique de ce MPF encore inactif est générée par la protéine cdc25C qui enlève les 2 phosphates en position 14 et 15 (Feilotter et al., 1992). Le MPF activé permet alors la phosphorylation d'une série de protéines nécessaires au déclenchement de la mitose.

# 2. La mort cellulaire

Quel que soit le traitement (chimiothérapie, radiothérapie ou hormonothérapie), l'objectif est de provoquer la mort des cellules tumorales. Cependant, il existe différents processus de mort cellulaire impliquant différentes voies de signalisation.

## 2.1. La transmission du signal

La transmission du signal est initiée par un stimulus au niveau membranaire, souvent par l'intermédiaire de récepteur trans-membranaire. Cette signalisation induit une cascade de phosphorylations aboutissant au niveau nucléaire. Il existe plusieurs voies de transmission du signal selon le type de récepteur et le type de cellules, mais le produit final d'activation au niveau nucléaire implique une famille de protéines appelées *MAP kinase* (pour *Mitogen Activating Protein*), dont la mission est de phosphoryler les gènes de transcription de l'ADN. Deux voies principales aboutissent à la transmission du signal : i) les protéines G et ii) les phospholipases (Albert et al., 1995).

### 2.1.1. Les protéines G

La stimulation de nombreux récepteurs membranaires est retransmise par une classe de protéines membranaires spécifiques, liant le GTP (Guanosine Tri-phosphate), appelées Protéines G. Elles couplent les récepteurs avec les effecteurs intracellulaires, et à ce titre exercent un contrôle important du signal. La plus étudiée des protéines G est la protéine *Ras*, une des protéines intermédiaires entre les récepteurs et les facteurs de transcription de l'ADN (dont c-myc et c-jun) (Albert et al., 1995).

# 2.1.2. Les phospholipases

La phospholipase C (PLC-g) est activée soit par l'intermédiaire d'une protéine G soit directement par phosphorylation d'un résidu tyrosine. La PLC-g hydrolyse les phospholipides contenant de l'inositol en deux seconds messagers : l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> permet l'activation de protéines kinases (ex : PKC), phosphatases et phosphodiestérases. Le DAG active spécifiquement la PKC qui elle même active des facteurs de transcription tels que NF $\kappa$ B, c-fos, c-jun et CREB/ATF (Albert et al., 1995).

# 2.2. Les différents processus de mort cellulaire

L'induction de la mort cellulaire peut s'exécuter selon un mécanisme de sénescence, de mort mitotique, d'apoptose ou de nécrose. Ces variations peuvent résulter soit de l'origine cellulaire soit du génotoxique appliqué, de sa dose et/ou de la durée de son application.

### 2.2.1. La sénescence

La plupart des cellules somatiques meurent après un nombre fini de division cellulaire par un phénomène de mort cellulaire programmée, défini comme la sénescence. Les télomères sont des séquences répétées d'ADN qui protègent l'extrémité des chromosomes de leur dégradation. Le raccourcissement des télomères est effectué après chaque division cellulaire. Lorsque ces séquences arrivent à une taille critique, les cellules deviennent sénescentes et se caractérisent morphologiquement par des cellules élargies, aplaties et granuleuses, biochimiquement par l'augmentation de l'expression de la *senescence associated*  $\beta$ -*galactosidase* et sont associées à un arrêt dans la phase G<sub>1</sub> du cycle sous le contrôle de p53 et p21 (Chang et al., 1999). Les télomérases sont des ribonucléoprotéines permettant le maintien de l'intégrité des télomères des cellules eucaryotes immortelles, des cellules humaines

transformées et des cellules tumorales mais pas des cellules somatiques normales. Des traitements génotoxiques peuvent endommager l'ADN au niveau des télomères et provoquer la sénescence tels que les radiations ionisantes (Crompton, 1997) ou les anthracyclines (Chang et al., 1999).

# 2.2.2. La mort mitotique

La mort mitotique, ou catastrophe mitotique, est caractéristique des populations cellulaires proliférantes, et est définie comme étant l'impossibilité d'une prolifération illimitée. Ce processus apparaît pour des cellules ayant subit un stress exogène et qui provoque des lésions au niveau de différentes macromolécules intracellulaires telles que l'ADN et les membranes cellulaires par les anthracyclines (Chang et al., 1999, Come et al., 1999 a) ou les radiations ionisantes, le fuseau mitotique par les taxanes. Le phénotype de la catastrophe mitotique (ou encore appelée mort cellulaire reproductive, ou différée) se traduit par un blocage dans la phase  $G_2/M$  sous le contrôle du complexe MPF. Ce phénotype se caractérise morphologiquement par l'apparition de mitoses aberrantes comme des cellules géantes multinuclées ainsi que des micronoyaux et s'achève par la mort cellulaire (Johnson et al., 1999). Cette succession d'événements peut survenir immédiatement après le stimulus ou de façon différée.

# 2.2.3. L'apoptose

L'apoptose est un second mode physiologique de mort cellulaire programmée. Ce type de mort est impliqué dans des fonctions physiologiques contribuant au maintien de l'homéostasie en programmant la destruction des cellules. Elle existe durant l'embryogenèse, le développement du système nerveux ou l'atrophie tissulaire endocrino-dépendant mais peut également être induite par des agents exogènes.

### 2.2.3.1. Description physiologique

L'apoptose affecte des cellules isolées et se déroule morphologiquement selon trois phases principales selon la description de Kerr, Wyllie et Currie illustrées dans la Figure 10 (Kerr et al., 1972).

➢ La première phase est caractérisée par la survenue brusque d'altérations nucléaires et cytoplasmiques. La chromatine se condense pour former un croissant homogène plus ou moins volumineux caractérisant des cellules en apoptose précoce et appelée margination. La chromatine subit alors un clivage internucléosomique dû à une endonucléase  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ dépendante produisant des fragments d'ADN de 180 ou de multiples de 180 paires de bases. Au niveau cytoplasmique, les organites se rapprochent et s'agglomèrent mais sans altérer leur intégrité. Alors que la membrane plasmique reste imperméable aux colorants vitaux, la cellule prend un aspect arrondi tandis que les desmosomes sont détruits et que les espaces intercellulaires s'élargissent (Wyllie, 1997)



Figure 10 : Aspects morphologiques de l'apoptose (Kerr et al., 1972).

➤ La seconde phase, qui peut chevaucher la première, est marquée par l'apparition de vésicules cytoplasmiques (corps apoptotiques) traduisant d'importantes modifications du cytosquelette. A ce stade, la cellule voit son volume diminuer considérablement et sa densité augmenter. Ce phénomène est accompagné d'une altération des glycoprotéines de la membrane cellulaire favorisant la reconnaissance et la phagocytose de la cellule apoptotique par les macrophages. Simultanément s'effectue une perte de l'asymétrie des phospholipides membranaires qui favorise également la phagocytose (Wyllie, 1997).

La troisième étape est marquée par la dégradation des corps apoptotiques. Une fois phagocytées, ces vésicules sont lysées à l'intérieur des phagosomes. Les lysosomes interviennent seulement au niveau terminal de la dégradation des corps apoptotiques phagocytés. La mort apoptotique *in situ* ne s'accompagne d'aucune réaction inflammatoire lymphocytaire et ne modifie pas l'architecture tissulaire. *In vitro*, les vésicules s'accumulent dans le milieu de culture pendant cette phase. Elles perdent leur intégrité membranaire et peuvent être détectées au moyen de colorants d'exclusion. Cette dernière caractéristique a généré pour cette étape l'appellation de "nécrose secondaire" (Wyllie, 1997).

#### 2.2.3.2. Régulation de l'apoptose

Les principaux facteurs induisant le signal de l'apoptose sont le stress (hyperthermie, hypooxygénation) ; le traitement par des substances cytotoxiques ou des radiations ionisantes ; l'atteinte de l'ADN ; la transmission du signal de mort (récepteur Fas des lymphocytes cytotoxiques, des naturels killer, du facteur de nécrose TNF $\alpha$ ) ; la privation de facteur de croissance.

Les gènes qui contrôlent l'apoptose sont nombreux et les mécanismes qui les contrôlent ne sont qu'en partie élucidés. Cependant tous ces signaux de mort cellulaire passent par un mécanisme principal commun impliquant la famille Bcl-2 et les mitochondries et ont pour effecteurs les caspases ou un facteur inducteur d'apoptose (ou AIF).

> Bcl-2 (*B-cell lymphoma/leukemia 2*) est le prototype d'une famille de 9 gènes contrôlant la mort cellulaire programmée. Parmi les membres de cette famille, on distingue les gènes antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bag<sub>1</sub>, Mcl-1, A1) et les gènes pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bcl-X<sub>s</sub>) qui sont capables de se dimériser entre eux selon différentes combinaisons. Le terme de rhéostat cellulaire a été proposé pour rendre compte du caractère déterminant de la proportion des différents homo et hétéro-dimères permettant d'engager la cellule vers l'apoptose ou la survie. Il semblerait que le ratio Bcl-2/Bax soit pris comme référence pour déterminer cette orientation (Durrieu et al., 1999).

Situé sur le chromosome 18, Bcl-2 est surexprimé dans un grand nombre de cancers. La protéine Bcl-2 est une protéine de 24-26 kDa et comprend une queue hydrophobe permettant son ancrage membranaire à différents sites tels que les membranes mitochondriales externes, le réticulum endoplasmique et les membranes périnucléaires. La protéine Bcl-2 a pour rôle de maintenir la survie cellulaire, mais elle ne stimule pas la prolifération. L'action des protéines de cette famille se situe au niveau des mégapores des mitochondries en permettant ou non la

libération du cytochrome c qui active les caspases. D'autre part, Bcl-2 inhibe la libération du Ca<sup>2+</sup> du RE afin d'empêcher l'activation des endonucléases calcium-dépendant chargées de dégrader l'ADN lors du processus apoptotique (Allen et al., 1998).

L'ensemble de ces mécanismes aboutit à l'activation d'un effecteur cytoplasmique commun appartenant à un groupe de protéines : les caspases. Les caspases comprennent actuellement 14 protéases à cystéine synthétisées sous forme de proenzymes inactives qu'un signal apoptotique permet de convertir en enzymes matures. Les caspases diffèrent dans la longueur de leur prodomaine N-terminal, mais on les distingue aussi par leur processus d'activation et la présence d'un module d'interaction protéique. Toutes les caspases ont une affinité commune pour les substrats comportant un résidu aspartate en première position. De nombreuses protéases sont modifiées par les caspases : polymérase, topo-isomérase I, protéine kinase dépendante de l'ADN. Certaines modifications aboutissent à l'activation d'enzymes promotrices de l'apoptose et notamment des endonucléases agissant sur des sites exposés entre les nucléosomes (Allen et al., 1998).

# 2.2.4. La nécrose

La nécrose est un processus de mort cellulaire qui peut se produire quand les cellules sont exposées à des variations extrêmes des conditions physiologiques normales (hyperthermie, irradiation, hypoxie, anticancéreux).

Lors d'un processus de nécrose, les cellules présentent des dommages cellulaires initialement au niveau de la membrane plasmique. Les échanges ioniques ne sont plus contrôlés et la cellule n'a plus la capacité de maintenir son homéostasie. L'eau entre donc librement dans la cellule. Le gonflement précoce des organites intracellulaires, et notamment des mitochondries, est caractéristique de ce type de mort. La lyse de lysosomes provoque la libération du contenu enzymatique hydrolytique dans la cellule participant ainsi à sa destruction. *In vivo*, la mort cellulaire par nécrose est souvent associée à une réponse inflammatoire provoquée par la libération d'enzymes lysosomales (Wyllie, 1997). Il est à noter que la plupart des traitements anticancéreux capables d'induire l'apoptose, provoque une nécrose lors d'exposition à forte dose.

## 3. Processus impliqués par les anthracyclines

Les travaux effectués sur le mécanisme d'action des anthracyclines, ont été réalisés de façon prépondérante sur les deux molécules mères de référence encore très utilisées en clinique : la

doxorubicine et la daunorubicine. Quelle que soit l'anthracycline et/ou le processus d'induction de mort cellulaire impliqué, la séquence complète des événements cellulaires probables n'est pas décrite *in vitro*. Un schéma récapitulatif simplifié des différentes réponses cellulaires aux anthracyclines sera proposé, issu de données spécifiques aux anthracyclines ou de revues générales (*Figure 11*). La réponse cellulaire aux anthracyclines est initiée à partir des différentes cibles, à savoir : l'ADN, les membranes et les mitochondries. La prépondérance d'une de ces voies est fonction de la molécule, de la dose et de la durée du contact, du modèle cellulaire.



Figure 11 : Schéma récapitulatif des processus cellulaires probables mis en œuvre après un traitement par anthracyclines : A) Signalisation et régulation de l'expression génique, B) arrêts du cycle et mort cellulaire

# 3.1. Signalisation et régulation de l'expression génique

La voie de signalisation reste discutée puisque les travaux de *Fulda et al.* ont montré une activation par la doxorubicine (0,5 µg/mL pendant 1h, analyse 72 h plus tard) autocrine et/ou

paracrine du système CD95/CD95-L (APO-1/Fas-L) (Fulda et al., 1998) alors que *Petak et al.* ont montré que cette voie n'était pas impliquée dans le mécanisme d'action cytotoxique de la doxorubicine (0,05-3  $\mu$ M pendant 72 h) (Petak et al., 2000). Par contre l'activation des caspases dans ce processus de signalisation semble être admise (Durrieu et al., 1998, Fulda et al., 1998, Petak et al., 2000).

Les céramides peuvent être générés par l'endommagement des membranes induit par les anthracyclines *via* l'activation de la sphyngomyélinase. *Mansat-De-Mas et al.* ont mis en relation la production de céramides et d'espèces réactives d'oxygène (ERO) induits par la daunorubicine (1  $\mu$ M pendant 1 h) sur cellules leucémiques, qui activeraient des facteurs de transcription précoces de réponses au stress tels que JNK et AP-1 (Mansat-de Mas et al., 1999). De plus, les anthracyclines semblent être impliquées dans l'activation des facteurs de transcription précoces au stress oxidatif. En effet, les résultats de *Boland et al.* suggèrent pour la daunorubicine (de 0,05 à 2,5  $\mu$ M pendant 1 à 24 h) sur deux modèles cellulaires en suspension, une activation de NFk-B de façon indépendante d'une production effective de céramides mais dépendante de la production d'ERO (Boland et al., 1997).

*Liao et al.* ont montré que les lésions au niveau de l'ADN peuvent initier la production des céramides *via* l'activation de la céramide synthase (Liao et al., 1999). L'endommagement de l'ADN par les anthracyclines (cassures double-brins, DSB/ cassures simples-brins, SSB), provoqué soit par des radicaux libres soit par la formation du complexe [ADN-TopoII-Anthracycline], induit l'activation de p21 (Gartenhaus et al., 1996, Hedenfalk et al., 1997) ou du complexe MPF (Ling et al., 1996).

# 3.2. Arrêts du cycle et mort cellulaire

L'effet antitumoral des anthracyclines s'exprime selon deux mécanismes qui peuvent être distincts : l'effet cytostatique (arrêt du cycle cellulaire) et l'effet cytotoxique (mort cellulaire). Selon les données de la littérature, issues principalement d'expérimentations *in vitro*, l'endomagement de l'ADN par les anthracyclines implique un blocage des cellules en  $G_1/S$  (Chang et al., 1999, Come et al., 1999 a, Ferraro et al., 2000, Vial et al., 1997) ou en  $G_2/M$  (Chang et al., 1999, Come et al., 1999 b, Petak et al., 2000, Vial et al., 1997). Les différents processus actifs de mort cellulaire associés aux arrêts du cycle sont la sénescence (Chang et al., 1999), la mort mitotique (Chang et al., 1999, Come et al., 2000, Vial et al., 2000, Come et al., 1997).

> L'arrêt en  $G_1/S$  provoqué par les anthracyclines serait sous la dépendance de P21 mais le rôle de P53 reste controversé (Gartenhaus et al., 1996, Hedenfalk et al., 1997).

Le gène p53, localisé sur le bras court du chromosome humain 17, est un gène suppresseur de tumeur. Son ARNm, possède 11 exons et code pour une phosphoprotéine kinase nucléaire. La protéine est divisée en 4 domaines : transactivation, fixation, oligomérisation, fixation non spécifique à l'ADN (Soussi et al., 1990). La forme active de cette protéine de 53 kDa est en fait un tétramère qui se fixe sur une séquence consensus (el-Deiry et al., 1992). Il agit comme un facteur de transcription en induisant ou réprimant la transcription de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires centraux tels que le cycle cellulaire, la stabilité génomique, la ségrégation des chromosomes, la sénescence et l'apoptose (Chang et al., 1999). La protéine P53 sauvage a également la capacité de réguler négativement l'expression d'un grand nombre de gènes cellulaires et viraux en s'associant notamment à la TBP (TATA box Binding Protein) (Chang et al., 1995) et à la CBF (CCAAT box Binding Factor) (Agoff et al., 1993).

La protéine P53 est un élément important de la voie activée en réponse aux dommages subis par l'ADN, ce qui lui vaut le surnom de "gardien du génome". En effet, on observe une accumulation nucléaire importante de cette protéine en réponse à des lésions de l'ADN génomique (Kastan et al., 1991). La protéine P53 est alors capable de transactiver plusieurs gènes dont p21<sup>WAF1/Cip1</sup> impliqué dans le blocage du cycle cellulaire en G<sub>1</sub>/S, GADD45 lié à la réparation de l'ADN ou encore Mdm2 qui inhibe l'activité transrégulatrice de p53 et permet la ré-entrée de la cellule dans le cycle cellulaire après la réparation des lésions. Si les dommages induits au niveau de l'ADN sont trop importants pour être réparés, P53 peut induire des gènes comme bax et en réprimer d'autres tels que bcl-2, afin d'induire l'apoptose (Liebermann et al., 1995). Les données *in vitro* indiquent que l'induction de l'apoptose par la doxorubicine peut s'effectuer selon un schéma p53-dépendant après 72 h de contact à 1 µM (Fulda et al., 1997) ou p53-indépendant après plus de 24 h à 100 nM (Gartenhaus et al., 1996). En outre, les cellules tumorales exposées à une dose modérée de doxorubicine peuvent également mourir par un mécanisme assimilé à la sénescence auquel p53 et p21 semblent contribuer (Chang et al., 1999).

Les céramides sont des médiateurs endogènes d'arrêt en  $G_0/G_1$  du cycle cellulaire par déphosphorylation de la protéine Rb. En outre, les céramides semblent générer et/ou participer à différents types de mort cellulaire, tels que l'apoptose ou la sénescence. Des travaux *in* vitro effectués avec la doxorubicine ou la daunorubicine ont mis en évidence une mort par apoptose précédée par la production de céramides (Bose et al., 1995, Jaffrezou et al., 1996).

→ L'arrêt en G<sub>2</sub>/M est dépendant du complexe MPF, et selon une récente hypothèse l'activation de P53 contribuerait à son maintien (Innocente et al., 1999). En fait, différentes équipes ont observé un arrêt en G<sub>2</sub>/M par le traitement sur des lignées tumorales avec des anthracyclines comme la doxorubicine (0,5-1  $\mu$ M) (Ling et al., 1996), la daunorubicine ou l'idarubicine (< à 40 et 20 nM respectivement) (Vial et al., 1997). L'inactivation du complexe MPF a été mis en évidence avec la doxorubicine (Ling et al., 1996). L'activation de p53 par la doxorubicine pourrait augmenter, sans être nécessaire, l'inactivation de ce complexe (Passalaris et al., 1999).

De manière générale, il est admis que l'arrêt en  $G_2/M$  traduit une instabilité génomique qui peut se poursuivre, si les dommages à l'ADN sont trop importants, par un processus de mort cellulaire mitotique. Toutefois, un stress cellulaire durant la phase mitotique peut provoquer des images d'apoptose (Sit et al., 1997). Concernant les anthracyclines, l'arrêt en  $G_2/M$  est associé à un processus de mort mitotique (Come et al., 1999 a) et/ou d'apoptose (Petak et al., 2000).

## 4. Apoptose et phénotype classique MDR

La résistance à la chimiothérapie se traduit par une inefficacité cytotoxique des agents utilisés, et qui peut correspondre à une incapacité à induire la mort cellulaire par le processus d'apoptose. Mais comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre précédent, la chimiorésistance et en particulier la résistance aux anthracyclines peut être initiée par le phénotype MDR.

# 4.1. La résistance à l'apoptose

Concernant les anthracyclines, l'activation des caspases se situe parmi les événements précoces détectables du processus d'apoptose aussi bien *in vitro* que sur échantillons cliniques (Durrieu et al., 1998). Cependant avant de converger vers la phase effectrice commune d'induction d'apoptose, il existe deux autres phases qui sont cruciales : i) une phase initiatrice impliquant différents sites intracellulaires et ii) une phase de contrôle mitochondrial (*Figure 12*). La phase de contrôle mitochondrial comprend la régulation de la libération à travers le pore mitochondrial de protéines apoptogéniques, telles que le cytochrome c ou les AIFs par les protéines de la famille Bcl-2 (Fulda et al., 1998). La

configuration de ces séquences positionne de façon centrale la mitochondrie, et en particulier le rôle des protéines de la famille Bcl-2.



Figure 12 : Scénario d'induction de l'apoptose par la doxorubicine dans des cellules de neuroblastome (Fulda et al., 1998).

*Fulda et al.* ont développé des modèles issus d'une lignée de neuroblastomes, transfectée avec bcl-2 ou bcl-Xl (Fulda et al., 1998). Ces modèles transfectés se sont révélés résistants à l'induction d'apoptose par la doxorubicine ( $0,5 \mu g/mL$  pendant 24 h). Par contre *Durrieu et al.* ont employé des modèles leucémiques résistants obtenus par sélection après traitement par la daunorubicine (Durrieu et al., 1999). Leurs résultats convergent vers le même concept, c'est-à-dire l'existence de mécanismes de résistance à l'apoptose. Ils ont mis en évidence, après une exposition à l'idarubicine (40 nM pendant 48 h) ou de céramides exogènes, une surexpression de la protéine Bcl-2 (avec Bax constant) associée à une diminution du pourcentage de cellules apoptotiques. En outre, cela confirme que l'évolution du ratio Bax/Bcl-2 reflète la capacité des cellules à entrer en apoptose après un traitement par anthracycline.

### 4.2. Relation(s) entre la résistance à l'apoptose et le phénotype MDR

Différentes équipes se sont intéressées à déterminer le facteur de trancription potentiel contrôlant le gène mdr1 dans les cellules tumorales. Plusieurs candidats semblent se détacher, telles que les protéines P53, MDM<sub>2</sub> et NF- $\kappa$ B.

Concernant la P53, sa forme mutée agit comme une oncoprotéine qui immortalise et transforme les lignées cellulaires primaires. En effet, les altérations au niveau du gène de p53 représentent l'événement mutationnel le plus fréquent dans les cancers humains (Greenblatt et al., 1994). L'altération des fonctions de P53 pourrait être un élément déterminant dans les mécanismes de résistance aux anticancéreux comme dans les mécanismes de résistance aux radiations ionisantes. La protéine P53 est connue pour moduler la transcription de certains gènes par affinité au niveau de leur séquence promotrice, et entre autre d'activer la transcription par voie *cis* du gène mdr1. Cependant le mécanisme par lequel P53 (sauvage ou muté) régule l'activité du gène mdr1 reste à élucider. L'étude effectuée par *Ogretmen et Safa* sur la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> a mis en évidence une déletion de 21 pb au début de l'exon 5 du gène p53 qui altère son niveau d'expression, sa stabilité et sa localisation. Ces résultats laissaient suggérer que le statut mutationnel de P53 pourrait être un des facteurs impliqués dans le développement de la *multidrug resistance* de cette lignée (Ogretmen et Safa, 1997).

En outre des lignées cellulaires tumorales présentant le phénotype classique MDR se sont révélées avoir des altérations du métabolisme lipidique. Les céramides biosynthétisés peuvent être soit transformés en sphingomyéline, soit en glucosylcéramides. Les glucosylcéramides servent de précurseurs à la synthèse de nombreux glycosphyngolipides et sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, alors que les céramides sont des messagers secondaires de l'apoptose. Effectivement, les travaux de *Lavie et al.* ont démontré pour la première fois que différentes lignées cellulaires associaient au phénotype MDR une accumulation de glucosylcéramide probablement par leur synthèse accélérée (Lavie et al., 1996). Le caractère multifonctionnel des glucosylcéramides laisse présager un rôle certain dans l'acquisition et/ou le maintien de la *multidrug resistance*. D'autant plus qu'il a été possible de détecter un niveau élevé de glucosylcéramide dans des échantillons de patients chimiorésistants (Lucci et al., 1998).

Des agents modulateurs du phénotype MDR de structures diverses (Tamoxifène, PSC-833, Cyclosporine A) sont capables respectivement d'inhiber la glucosylcéramide synthase et

d'activer la ceramide synthase dans des lignées cellulaires MDR. Les résultats obtenus sur le couple MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup> avec la doxorubicine (0,5  $\mu$ M ; 24 h en continue) démontrent que certaines combinaisons de modulateurs, à des concentrations applicables en clinique, permettent de restaurer le niveau de production de céramide et donc la sensibilité à la doxorubicine (Lucci et al., 1999 b).

.

# **RESUME DU CHAPITRE III**

La réponse cellulaire aux anthracyclines peut se mesurer aussi bien au niveau du cycle cellulaire que du processus de mort cellulaire induit. Quelle que soit l'anthracycline et/ou le processus d'induction de mort cellulaire impliqué, la séquence complète des événements cellulaires n'est pas décrite in vitro.

Les différentes modalités de réponse cellulaire aux anthracyclines sont initiées à partir des différentes cibles : l'ADN, les membranes et les mitochondries. Parmi la séquence des événements, il est possible de distinguer la signalisation et la régulation de l'expression génique ainsi que les modifications du cycle cellulaire et le processus de mort cellulaire induit.

Les anthracyclines sont décrites principalement comme source d'arrêt en  $G_2/M$  associé en général à la mort mitotique mais pouvant également provoquer la mort par apoptose. Récemment des travaux ont montré que les anthracyclines pouvaient générer un blocage en  $G_1/S$  associé classiquement à l'apoptose ou encore, mais moins fréquemment, à la sénescence.

La résistance à la chimiothérapie se traduit par une inefficacité cytotoxique des agents utilisés, et qui peut correspondre à une incapacité à induire la mort cellulaire par le processus d'apoptose.

D'une part, il existe des mécanismes spécifiques de résistance à l'apoptose évaluables après traitement par les anthracyclines, par l'intermédiaire de l'expression des protéines Bax/Bcl-2. D'autre-part, le phénotype classique MDR semble être intimement lié à des facteurs de transcriptions impliqués également dans la régulation de l'apoptose comme P53. En outre, des lignées cellulaires tumorales sélectionnées, présentant le phénotype classique MDR, se sont révélées avoir des altérations du métabolisme lipidique, qui contrôle entre autre l'apoptose, et de ce fait laissent présager un rôle certain dans l'acquisition et/ou le maintien du phénotype MDR.

PARTIE EXPERIMENTALE

# Chapitre III : Partie Expérimentale

### **I OBJECTIFS**

La mise en place du poste de microscopie de fluorescence conventionnelle 2D a été réalisée afin de résoudre certaines des problématiques biologiques. Cette instrumentation permet dans un premier temps d'effectuer sur cellules vivantes des procédures d'analyse d'images qualitatives et/ou quantitatives grâce à l'épaisseur réduite des cellules adhérentes. Le caractère évolutif du poste permet d'envisager des études préliminaires concernant l'impact de la déconvolution ainsi que des mesures de spectres intracellulaires. Ce travail a été effectué grâce à des collaborations entre instrumentalistes et biologistes permettant de faire coïncider les contraintes biologiques avec celles de l'instrumentation. L'ensemble des travaux de caractérisation des dispositifs expérimentaux associés au poste de microscopie de fluorescence, ainsi que de leurs validations, ont fait l'objet des thèses de doctorat de *MP Gramain* et *JJ Padilla-Ybarra*.

La première partie de notre travail a consisté à étudier la distribution de la daunorubicine (DNR), une anthracycline de référence, son altération et sa modulation dans le phénotype MDR classique.

Notre étude bibliographique a mis en évidence que la séquestration cytoplasmique des anthracyclines est plus largement documentée *in vitro* pour des lignées cellulaires leucémiques que pour des modèles cellulaires adhérents et principalement avec la *multidrug resistance related protein* (MRP). Sa description reste très limitée pour des prélèvements leucémiques aussi bien concernant sa caractérisation que sa modulation.

C'est pourquoi il nous a semblé utile d'envisager d'aborder cette thématique selon deux volets. Le premier volet concerne la compréhension *in vitro* du phénomène de séquestration cytoplasmique de la DNR au sein de modèles expérimentaux adhérents. Le second consiste à déterminer son existence si possible en évaluant sa fréquence d'apparition et sa localisation, puis sa modulation au sein de prélèvements leucémiques. **1. La caractérisation** *in-vitro* de la séquestration cytoplasmique de la DNR au sein d'une lignée adhérente de phénotype MDR surexprimant la glycoprotéine-P (P-gp). Les lignées MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup> ont été retenues, car nos travaux préliminaires ont mis en évidence la séquestration de la DNR au sein de la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. Pour ce faire nous avons déterminé plusieurs problématiques biologiques à résoudre :

• Déterminer par analyse d'images la localisation intracellulaire des sites de séquestration de la DNR.

• Déterminer la configuration moléculaire de la DNR au niveau intracellulaire par l'intermédiaire de son spectre de fluorescence.

• Déterminer une procédure optimale de réversion du phénotype MDR classique.

2. L'évaluation préliminaire de ce phénomène dans le contexte clinique. Peu de données à ce sujet existent, et exclusivement pour des prélèvements issus de LAM adultes. C'est pourquoi, nous avons étudié la distribution de la DNR au sein de prélèvements leucémiques, en particulier pour des prélèvements de LAL d'enfants.

La seconde partie de notre travail a consisté à évaluer des anthracyclines de seconde génération, sur différents modèles cellulaires adhérents comprenant des lignées de cancer du sein et de cancer pulmonaire présentant le phénotype classique MDR.

Notre étude bibliographique a mis en évidence l'intérêt des molécules lipophiles et en particulier de l'idarubicine (IDA), aussi bien pour son mécanisme d'action que pour son potentiel en clinique. Le choix des modèles cellulaires adhérents s'est orienté vers des couples comprenant des lignées de phénotype MDR associé à la P-gp ou la MRP. La présence de ces protéines permet d'étudier l'impact de différents mécanismes d'efflux et de séquestration cytoplasmique. En outre les lignées résistantes sélectionnées reflètent la complexité des mécanismes multifactoriels pendant une chimiothérapie qui implique des agents d'origine naturelle. Là aussi, la démarche s'est organisée selon différentes étapes. Dans un premier temps, il s'agit de caractériser leurs propriétés pharmacologiques au niveau cellulaire. Puis dans un second temps, l'objectif est de comparer la réponse cellulaire après le traitement des lignées cellulaires par les anthracyclines sélectionnées.

**1. La caractérisation pharmacologique au niveau cellulaire** des anthracyclines comprend différents paramètres à déterminer, voici ceux que nous avons retenu :

• L'évaluation de l'incorporation et de la rétention des deux anthracyclines pour les lignées parentales et résistantes.

• L'étude de leur distribution subcellulaire au sein des différentes lignées.

# 2. La réponse cellulaire est évaluée pour les deux anthracyclines, avec les études suivantes :

• La comparaison de l'efficacité cytotoxique des deux anthracyclines pour les lignées parentales et résistantes pour différentes durées d'exposition (2 et 24 h)

- Détermination du processus d'induction de la mort cellulaire
- Implication de la voie P53 et de la voie des céramides dans l'induction de l'apoptose

# **II MATERIELS ET METHODES**

Ce chapitre comprend les matériels et méthodes utilisés dans les deux parties expérimentales qui suivent. Il a pour vocation d'une part de définir les critères qui ont déterminé le choix du matériel et d'en présenter les caractéristiques principales, et d'autre part de décrire les différentes méthodes utilisées. Pour certaines méthodes, leurs descriptions seront succinctes puisque dans le chapitre suivant seront intégrées les 2 publications directement liées au sujet de la thèse (Bour-Dill et al., 2000, Merlin et al., 2000).

# 1. Substances chimiques

### 1.1. Les anthracyclines

Les anthracyclines, daunorubicine (**DNR**, Cérubidine® ; Rhone Poulenc Rorer Bellon, Neuilly, France), idarubicine (**IDA**, Zavedos® ; Pharmacia&Upjohn, St Quentin Yvelines, France), épirubicine (**EPI**, Farmarobucine® ; Pharmacia&Upjohn, St Quentin Yvelines, France) sont fournies sous forme de lyophilisats et sont dissoutes dans de l'eau pour préparation injectable. Les solutions mères sont conservées à -18°C, les aliquots sont conservés quelques jours à 4°C.

## 1.2. Les modulateurs

Le S9788 (dérivé de triazinoaminopipéridine ; Servier, Courbevoie, France), la cyclosporine A (CsA) et son dérivé le PSC-833 (Valspodar®) (Novartis, Bâle, Suisse) sont fournis généreusement respectivement par Servier et par Novartis. La CsA et le PSC-833 sont dissous dans une solution d'éthanol/eau (70/30 ; v/v) aux concentrations souhaitées en fonction des applications sur lignées ou sur cellules issues de prélèvements cliniques.

# 2. Lignées cellulaires et prélèvements leucémiques

### 2.1. Lignées cellulaires

La lignée MCF-7 a été établie à partir d'une métastase pleurale d'un adénocarcinome mammaire humain provenant d'une femme ménopausée (Brooks et al., 1973). La lignée A549 a été établie à partir d'un adénocarcinome pulmonaire humain (CNPC) provenant d'un

patient de 58 ans (Giard et al., 1973). La lignée MCF- $7^{DXR}$  a été obtenue par induction à la doxorubicine (**DXR**). Cette lignée ainsi que la lignée MCF-7 parentale ont été généreusement données par le Dr S. Chevillard (Institut Curie, France). La lignée A549 T<sub>3</sub> a été établie par *Solis Recendez G*. dans le cadre de sa thèse par induction au taxol (**TXL**, Paclitaxel®, Sigma) (Solis Recendez, 1999) alors que la lignée A549 V<sub>3</sub> a été établie par *Trussardi A*. dans le cadre de sa thèse par induction à l'étoposide (**ETP**, Dakota® Pharm, Sanofi, Gentilly, France) (Trussardi et al., 1998). Le critère premier de sélection concernait leur phénotype MDR classique, puis dans un second ordre leur statut p53. Ces critères sont présentés dans le *Tableau 6*.

Lignées	MDR classique		P53 °	Induction <sup>d</sup>			
	P-gp/mdr1 <sup>a</sup>	MRP/mrp1 <sup>b</sup>		Médicament	Modalité	IR	
MCF-7	1,4 / 0,01	7,3 / 1,01	Sauvage	Ø	Ø	Ø	
MCF-7 <sup>DXR</sup>	91,8 / 1,64	9,9/1,41	Mutée	DXR	Continu	200	
A549	0,6 / 0,03	15,1 / 2,00	Sauvage	Ø	Ø	Ø	
A549 T <sub>3</sub>	85,1 / 1,50	19,4 / 1,97	Sauvage	TXL	Continu	62	
A549 V <sub>3</sub>	1,6 / 0,03	60,3 / 2,75	Sauvage	ETP	Continu	22	

Tableau 6 : Récapitulatif des caractéristiques des lignées.

Les critères en <sup>a et b</sup>, contrôlés par nos soins, correspondent d'une part aux pourcentages de cellules marquées par les anticorps anti- P-gp ou - MRP obtenus en cytométrie de flux (méthodes décrites dans le paragraphe dédié à la cytométrie en flux), et d'autre part le ratio d'expression d'ARNm mesuré entre le gène cible et le gène de référence gapdh (méthodes décrites dans le paragraphe dédié à la RT-PCR semi-quantitative). Ils apparaissent en gras lorsqu'ils sont significativement différents du contrôle parental. Le critère <sup>c</sup> a été contrôlé par SSCP pour ces différentes lignées par S. Lizard au centre G.F. Leclerc de Dijon. <sup>d</sup> Cette colonne contient les informations relatives à l'induction de la résistance, c'est-à-dire : l'agent naturel initiant la résistance (Médicament), la modalité d'induction, c'est-à-dire par exposition continue à dose croissante, ainsi que l'indice de résistance obtenu à l'agent inducteur (IR).

*La culture cellulaire* Le matériel de culture cellulaire provient de chez Costar (Dutscher, Brumath, France). Les lignées cellulaires adhérentes sont cultivées en monocouche dans une étuve à 37°C en atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> et 90% d'humidité. L'entretien est effectué en flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup> dans du milieu de culture RPMI 1640 (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), sans rouge de phénol, additionné à 9% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur (Dutscher SA, Brumath, France), 100U-100 µg/mL de pénicillinestreptomycine (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 2 mmol/L de L-glutamine (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), et trypsinées tous les 7 jours. Chaque expérimentation est réalisée sur cellules en phase exponentielle de croissance. Le temps de doublement de ces
lignées est entre 24 et 28 heures à l'exception de la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> qui a un temps de doublement de 43  $\pm$  12 h (données non présentées). La pression de sélection des cellules résistantes est maintenue spécifiquement pour chaque lignée. Les MCF-7<sup>DXR</sup> sont cultivées en continue avec 10  $\mu$ M de doxorubicine (**DXR**, Adriblastine® ; Pharmacia&Upjohn). Une semaine avant toute expérimentation, les cellules sont cultivées sans DXR. Les A549 T<sub>3</sub> sont cultivées toutes les 2 semaines en présence de 1  $\mu$ M de taxol (Paclitaxel®, Sigma, St Quentin Fallavier, France) durant 5 jours, et les A549 V<sub>3</sub> sont cultivées toutes les 2 semaines en présence de 5  $\mu$ M d'étoposide (Sanofi) durant 5 jours.

# 2.2. Prélèvements leucémiques

Les échantillons de moelle sont issus de prélèvements effectués dans le cadre d'analyses cytologique chez les enfants (< 15 ans ; 7 LAL au diagnostic et 1 LAL en rechute) ainsi que chez les adultes (4 LAM au diagnostic,). Les cellules sont récupérées après passage sur Histopaque® 1077 (Sigma), et centrifugées à 1500 g pendant 10 min à 4°C. Puis elles sont mises en suspension dans du milieu enrichi : RPMI 10% SVF + 0,1% ITS (Insuline 5 mg/mL, Transferrin 5 mg/mL, Sélénium 0,005 mg/mL) (Merlin et al., 1994). La fraction leucocytaire récupérée présente plus de 80% de cellules atypiques

#### 3. Etude de la cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité cellulaire est effectuée par le test colorimétrique au bromure de 4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (**MTT** ; Sigma, St Quentin Fallavier, France). Le principe du test au MTT est basé sur la capacité des cellules vivantes à métaboliser ce composé, jaune pâle en solution aqueuse, en sel de formazan de coloration brune qui absorbe la lumière vers 540 nm. Ainsi, seules les cellules, dont l'activité mitochondriale respiratoire est intacte, sont capables de réduire le MTT par les succinates déshydrogénases en cristaux de formazan. Cette technique, présentant l'avantage d'être rapide, a été comparée dans la littérature aux essais clonogéniques (essais de référence en culture cellulaire) et une corrélation significative a été démontrée entre les deux méthodes (Carmichael et al., 1987, Merlin et al., 1992).

Cet essai est effectué en plaques 96 puits dans lesquelles ont été ensemencées les cellules aux concentrations souhaitées (en fonction des lignées et de la durée de culture). Après incubation, les anticancéreux sont ajoutées dans les puits à des concentrations croissantes. A

la fin du contact les cellules sont lavées puis, sont analysées directement en ajoutant la solution de MTT (5 mg/mL) diluée dans du PBS pendant 3 h afin de permettre la métabolisation du colorant. L'intégrité cellulaire est détruite par l'ajout de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 25%. L'absorbance est lue à 540 nm sur un lecteur de microplaques (Titertek Multiskan ® MCC/340, Flow Laboratories, Les Ulis, France).

A 540 nm la linéarité du test colorimétrique au MTT, en fonction du nombre de cellules par puits, est vérifiée pour chaque lignée cellulaire, à chaque concentration utilisée.

Le blanc a été déterminé à partir de puits contenant du milieu RPMI, de la solution MTT et du SDS mais sans cellule ni xénobiotique. Les résultats sont exprimés en terme de prolifération par rapport à un témoin non traité. L'analyse des effets obtenus est réalisée en se basant sur le principe décrit par *Chou et Talalay* (Chou et Talalay, 1984). La concentration inhibant la croissance cellulaire de 50% (IC<sub>50</sub>) pour chaque composé et pour chaque lignée cellulaire. Les résultats représentent la moyenne d'au moins trois essais indépendants. Ensuite, sont calculés les indices de résistance (IR) pour chaque composé.

 $IR = IC_{50}$  lignée résistante/  $IC_{50}$  lignée sensible

# Lignées cellulaires

Différents contacts sont utilisées en fonction des objectifs et des anticancéreux utilisés. Pour une exposition aux anthracyclines de courte durée (2 h), l'analyse est effectuée soit directement après le contact, soit 72 h après le lavage des cellules. Pour une exposition de 24 h, les cellules sont remises en culture après lavage pendant 48 h, et finalement analysées. L'ensemencement des cellules varie en fonction des lignées afin de faire l'évaluation sur 1 à 3 temps de doublements. Pour 6 jours de culture, les MCF-7 sont ensemencées à  $0,4.10^4$  cellules/mL, les MCF-7<sup>DXR</sup> à  $1.10^4$  cellules/mL, les A549 à  $0,4.10^4$  cellules/mL, A549 T<sub>3</sub> à  $0,6.10^4$  cellules/mL, A549 V<sub>3</sub> à  $0,6.10^4$  cellules/mL. Après l'incubation en présence des anticancéreux, les cellules sont lavées au PBS, puis incubées avec du MTT pendant 3 h et analysées.

L'effet d'un modulateur seul ou combiné est évalué pour le couple MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup> en comparant la cytotoxicité mesurée sur cellules co-incubées avec la DNR. Les associations

effectuées, ainsi que la méthode d'analyse des résultats sont décrits dans l'article intégré dans le *chapitre VI*, dans le paragraphe *Réversion du phénotype MDR* (Merlin et al., 2000).

# Prélèvements leucémiques

Après récupération, les cellules leucémiques sont ensemencées  $(3.10^6 \text{ cellules/mL})$  et la cytotoxicité est évaluée pour 5 concentrations de DNR (0,02; 0,09; 0,18; 0,89; et 1,77  $\mu$ M). Les cellules sont alors mises en culture pendant 72 h. Puis les plaques sont centrifugées et les cellules sont remises en suspension dans du milieu avec du MTT pendant 3 h et sont finalement analysées.

## 4. Microscopie de fluorescence

Les techniques de microscopie de fluorescence permettent selon l'instrumentation d'associer des analyses qualitatives, voire quantitatives sur des échantillons d'origines variées.

# 4.1. Dispositif expérimental

# 4.1.1. Le microscope

Au niveau du microscope, deux concepts optiques sont possibles : le microscope droit ou inversé. Le choix de la technique est dicté par l'application biologique et par l'objectif en termes d'analyse. *Le microscope inversé* est particulièrement requis pour des applications sur le vivant impliquant une approche dynamique telle que : la réponse cellulaire en fonction des modifications des conditions expérimentales (pH, oxygène), la cinétique d'incorporation (médicament, sondes ioniques), ou l'analyse d'un événement physiologique (mort cellulaire, division cellulaire). *Le microscope droit* est adapté aussi bien aux études sur échantillons fixés que vivants, et contrairement à l'inversé, permet une observation de l'échantillon directement dans son milieu de culture en utilisant un objectif à immersion à eau.

La microscopie de fluorescence conventionnelle convient aux applications nécessitant une acquisition rapide des données. La durée de recueil des données intervient pour les études sur le vivant, afin de maintenir des conditions compatibles avec la survie de l'échantillon, ainsi que pour les études de fluorochromes peu *photostables*, ou cytotoxiques sous irradiation, qui impliquent des irradiations brèves avec une irradiance minimum et un système de détection suffisamment sensible aux faibles signaux.

Le microscope droit à épifluorescence PROVIS AX70 (Olympus, Rungis, France) est l'outil central du poste qui a été caractérisé au cours de la thèse de doctorat de *MP Gramain* (Gramain, 2000). Il offre une large gamme de configurations et permet le passage rapide d'un mode d'observation à un autre (fond clair, fluorescence). Son statif très stable est conçu pour recevoir différents types de tête en fonction des dispositifs complémentaires à ajouter au poste (capteur, caméra, ...). Ce microscope est équipé d'une tête (U-MPH) multi-port de sortie (oculaires, port 1, port2, et deux sorties latérales). Chacune des sorties reçoit 100% de l'information lumineuse provenant de l'échantillon.

Le poste est équipé de deux sources lumineuses contrôlées par un *shutter* mécanique. L'une des sources (lampe halogène) assure les observations traditionnelles en fond clair et la seconde, une source à vapeur de mercure (HBO, Olympus), assure l'excitation des échantillons pour la fluorescence.

De plus, il comprend diverses motorisations (tourelle porte objectif, tourelle porte filtre, choix de sortie), associé à un multi-contrôleur (U-MCB, Olympus), ces motorisations peuvent être directement pilotées par ordinateur. Sa platine porte-objet comporte une résolution spatiale en XY de 10  $\mu$ m et axiale Z de 1  $\mu$ m.

# 4.1.2. Les objectifs

Les objectifs ont été choisis dans une gamme *universal inifinite system* corrigée à l'infini. Ils sont plans afin de s'affranchir des problèmes de courbure de champ. Les objectifs plan apochromatiques assurent une correction des aberrations chromatiques pour trois longueurs d'onde. Les trois objectifs suivants 100x, 40x et 10x sont de type UPLAPO (*Universal Plan Apochromat*). Ils sont appropriés pour des travaux de recherche, car les images formées par ces objectifs sont d'une excellente définition, d'un contraste et d'une résolution remarquables.

Les objectifs 100x et 40x sont particulièrement adaptés aux études cytologiques. L'objectif 100x (WD = 0,1 mm) possède une ouverture numérique variable de 0,5 à 1,35, mais seule la forte ouverture numérique a été utilisée. De plus, dans le cadre du partenariat établi avec la société OLYMPUS, nous avons utilisé l'objectif 60x PSF/NA1,2 (WD = 0,25 mm). Cet objectif est corrigé pour les divers types d'aberrations citées précédemment (sphériques, chromatiques, courbure de champ ...). Il est particulièrement adapté pour des applications impliquant des procédures de déconvolution dont le principe sera brièvement décrit dans le

paragraphe 4.1.6.2 Microscopie par coupes optiques sériées. L'objectif 100x est à immersion à huile d'un indice de réfraction de 1,516 et l'objectif 60x est à immersion à eau.

# 4.1.3. Les filtres

Les filtres de densité neutre (fdn). Ils sont utilisés pour atténuer la lumière d'excitation afin de limiter les phénomènes de photoblanchiment des fluorophores et d'éviter la destruction de l'échantillon biologique par échauffement local. Nous avons choisi trois valeurs de transmission : 6%, 25% et 1,5% (6%x25%) (Olympus).

*Combinaisons de filtres.* Pour étudier le maximum de fluorophores, nous disposons des filtres suivants (Olympus) :

- passe-bande (PB) : 330-385 nm, 400-440 nm, 420-460 nm, 460-490 nm, et 510-550 nm

- passe-haut (PH) : 475 nm, 515 nm et 590 nm

- miroirs dichroïques (MD) : 400 nm, 455 nm, 505 nm et 570 nm.

Les blocs filtres peuvent être configurés au plus juste en fonction des fluorophores étudiés.

# 4.1.4. Les détecteurs

# 4.1.4.1. Les caméras

La caméra CCD refroidie LH 1600 (LHESA Electronique, Cergy-Pontoise, France) comporte deux étages Peltier assurant une baisse de la température de -40°C. Elle possède un *shutter* pilotable permettant de fixer le temps d'exposition du capteur à la lumière (de 0,1 ms à quelques minutes). Le signal numérique de sortie est codé sur 12 bits, soit 4096 niveaux de gris au niveau de l'image. Ces caractéristiques permettent de détecter sur une même image les faibles et forts signaux de fluorescence. La caméra LH-1600 comprend des pixels de taille 9,0x9,0  $\mu$ m<sup>2</sup>. La carte d'acquisition est une carte Magic (Matrox, France).

La caméra Sensys (Photometrics, Tucson, AZ) associée au système Cellscan<sup>TM</sup> est une caméra CCD refroidie 12 bits, refroidie par effet Peltier à  $+10^{\circ}$ C possédant des pixels de taille 6,8 x 6,8  $\mu$ m<sup>2</sup>.

# 4.1.4.2. Le spectromètre

Un spectromètre CP 200 (Jobin Yvon, France) est adapté sur l'une des sorties du microscope grâce à la tête, conçue pour recevoir une fibre optique de mesure et une caméra pour contrôler et visualiser l'image de la zone de mesure. Ce dispositif, décrit dans le paragraphe 4.1.6.3 Microspectrofluorimétrie, a été caractérisé dans un premier temps par des

expérimentations sur différents modèles (Padilla Ybarra, 1999), puis des mesures préliminaires de spectres intracellulaires ont été effectuées.

## 4.1.4.3. Le photomultiplicateur

Le photomultiplicateur de type E717-23 (Hamamatsu, Japon) peut être adapté soit directement sur la première sortie du microscope, soit positionné à l'autre extrémité de la fibre couplée, ou encore sur la seconde sortie du microscope. Pour les mesures de photoblanchiment de fluorochrome au niveau intracellulaire, la première solution a été retenue avec une mesure de l'intensité complète du champ d'observation.

# 4.1.5. L'environnement d'analyse d'images

Le logiciel AnalySIS 2.11 version Professionnelle (SIS, Münster, Allemagne) offre un environnement comprenant un grand nombre de fonctions d'analyse et de traitement d'images, applicables à des images 8, 12, 16 et 24 bits. Il permet d'archiver les images et de constituer une base de données précise. Le logiciel permet également d'effectuer des analyses quantitatives statistiques sur des images préalablement traitées. Les éléments comptabilisés peuvent être répertoriés en différentes classes en fonction de divers critères (taille, forme...). L'enregistrement de macro-commandes permet d'automatiser les analyses effectuées, jusqu'au transfert des résultats vers un tableur (Excell). Le logiciel offre un environnement de programmation intégré (Imaging C), permettant d'accéder à l'ensemble des fonctions d'analySIS et de développer d'autres fonctionnalités. Des modules spécifiques peuvent être ajoutés tels que le module *AX70* et le module *Acquisition* de la caméra LH-1600.

#### 4.1.6. Les installations

### 4.1.6.1. Conventionnelle 2D

Dans l'objectif d'une démarche analytique, différents critères nous ont orienté vers un poste conventionnel plutôt que confocal.

L'effet confocal est séduisant car il permet de limiter les informations hors focalisation, par l'intervention de deux diaphragmes (ou *pinholes*) placés d'une part devant la source lumineuse, d'autre part devant le détecteur. Cependant il reste différents aspects rédhibitoires associés à cette technique.

• L'acquisition des signaux point par point rend incompressible l'existence d'un délais temporel pour parcourir l'échantillon ou la région d'intérêt. De ce fait, cette technique ne permet pas de refléter un état instantané de la distribution du fluorochrome étudié (localisation ou spectre). L'impact de l'artefact généré par cette latence est fonction de l'application envisagée (échantillon et/ou fluorochrome à analyser).

• Les détecteurs utilisés en microscopie confocale sont des photomultiplicateurs. Ces détecteurs affichent de faibles rendements quantiques de l'ordre de 0,1 à 0,35 contre des efficacités quantiques de l'ordre de 0,6 à 0,8 pour des détecteurs d'imagerie de type SITs ou CCDs utilisés en microscopie de fluorescence conventionnelle (Agard et al., 1989).

• L'observation de plusieurs fluorophores au sein d'un même échantillon excitable à des longueurs d'onde différentes peut être difficile voire impossible avec une source unique. Seule l'association de deux lasers tels que l'argon et le krypton permet d'exciter de manière optimale un grand nombre de fluorophores. En outre, toute la gamme des fluorophores excitables dans l'UV implique encore de lourds investissements financiers.

Le problème majeur rencontré en microscopie de fluorescence conventionnelle est posé par la présence d'un bruit de fond issu des plans hors focalisation qui se superpose à l'image observée. En effet, si la mise au point se fait bien sur un plan focal précis, par contre l'information collectée est entachée d'un bruit de fond, résultant de l'excitation par la source lumineuse de toutes les molécules fluorescentes situées sur le trajet de la lumière. Toutefois, cet inconvénient peut-être limité par un échantillon de faible épaisseur tel que l'implique des cellules adhérentes monocouche, ainsi que par l'optimisation des conditions expérimentales (condition du marquage du fluorochrome, objectif et NA utilisés ...).

Le poste utilisé comprend deux stations de travail type Pentium, reliées entre elles par un réseau local sur lesquelles a été installé le logiciel précédemment décrit. La première station assure le pilotage des diverses motorisations du microscope, ainsi que le pilotage de la caméra. La seconde permet non seulement l'archivage des images, mais aussi leur analyse et leur traitement. De cette façon, le poste permet de mener en parallèle expérimentation et exploitation (*Figure 13*).



Figure 13 : Schéma du poste de microscopie de fluorescence (Gramain, 2000).

La flexibilité du microscope AX70 (multi-port de sortie, tête modulable...) rend ce système évolutif et donc particulièrement adapté à la recherche afin de répondre aux exigences des différentes études.

### 4.1.6.2. Microscopie par coupes optiques sériées

Afin d'effectuer des études sur des volumes d'intérêt plus importants, tels que le volume cellulaire complet ou des échantillons épais (coupes tissulaires, sphéroïdes), il est nécessaire d'utiliser des techniques tridimensionnelles. Différentes techniques permettent d'accéder à la troisième dimensions : la microscopie confocale à balayage, la microscopie bi-photonique, ou la microscopie par coupes optiques sériées.

• Concernant la microscopie confocale à balayage *CLSM*, l'intérêt principal de l'effet confocal consiste à réduire considérablement les informations provenant des plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation. L'image tridimensionnelle de l'échantillon est construite point par point par déplacement séquentiel (Mason, 1993). Cependant l'effet de latence impliqué par le balayage est amplifié avec la troisième dimension, et peut s'avérer particulièrement limitant dans certaines applications (fluorochrome peu photostable ou cytotoxique durant l'irradiation, caractère dynamique de la distribution du fluorochrome sous irradiation).

• Afin de palier les inconvénients associés à la *CLSM*, une nouvelle technique fondée sur l'excitation bi-photonique a été mise au point par Webb. en 1990. La microscopie bi-photonique consiste à irradier un fluorophore par une source de lumière (laser) dans le rouge ou l'infrarouge. Le principe de la bi-photonie est basé sur l'absorption simultanée de deux photons de faible énergie et de longueur d'onde élevée, afin d'assurer la transition de la molécule dans un état excité.

Ce phénomène présente plusieurs avantages. Le caractère peu probable de l'événement d'absorption bi-photonique implique qu'aucune émission de fluorescence ne sera possible dans des régions hors du point de focalisation. La résolution et la sensibilité sont identiques au meilleur dispositif confocal (Shotton, 1995). Les phénomènes de photoblanchiment sont considérablement réduits. Cependant, comme les objectifs ne sont pas traités pour les longueurs d'onde dans l'infrarouge, des aberrations chromatiques pourront être observées, puisque la zone de l'échantillon irradiée dans l'infrarouge ne correspond pas en réalité à la zone détectée dans le visible. La technique implique une caractérisation biphotonique des fluorophores (spectres, rendement quantique, stabilité, dépendance environnementale, etc ...). La viabilité des échantillons biologiques sous excitation bi-photonique reste à évaluer. Les résultats obtenus sont très prometteurs, mais le principal inconvénient est le coût dû aux sources lasers.

• La microscopie par coupes optiques sériées ou "optical sectioning microscopy" (OSM) est une méthode alternative à la microscopie confocale. La technique consiste à illuminer de manière globale l'échantillon 3D et à enregistrer un ensemble d'images 2D par déplacement de l'objectif par rapport à l'échantillon. L'échantillon étant transparent, le plan de focalisation peut alors être déplacé à travers ce dernier. Les informations du plan de focalisation et hors plan de focalisation sont contenues dans chaque image 2D (Patrick et al., 1995).

L'image observée est une version dégradée de l'objet réel. Lors de sa formation par le système optique, l'image d'un objet fluorescent va subir des altérations dues au phénomène de diffraction. La façon dont le système optique entraîne des distorsions et dégrade l'image d'un objet est mise en évidence par la réponse impulsionnelle optique (ou *Point Spread Function*, *PSF*) du système (*Figure 14*). Cette dernière décrit comment l'image d'une source ponctuelle idéale est transmise à travers le microscope. Si ce dernier était un système idéal, la *PSF* serait un point. Or les limites imposées par l'ouverture numérique de l'objectif et les erreurs introduites par les éléments hors focalisation produisent globalement une *PSF* floue (Gramain, 2000).



Figure 14 : Principe de la convolution d'une scène d'origine f par la réponse impulsionnelle optique du système h qui aboutit à une image g bruitée n (Gramain, 2000).

La réponse impulsionnelle optique du système complet est introduite dans les algorithmes de déconvolution d'images. Ces algorithmes reposent sur l'hypothèse que l'image, obtenue à travers un système linéaire invariant par translation, est le résultat d'un produit de convolution de l'objet par la *PSF* du système. Les images d'échantillons biologiques peuvent aussi être traitées grâce à un algorithme de déconvolution. Cet algorithme permet de détecter la partie floue d'un plan et de réassigner cette information à son plan d'origine, en tenant compte de l'information contenue dans la réponse impulsionnelle optique du système.

On peut alors analyser l'échantillon en trois dimensions avec une résolution comparable à la résolution confocale. Cette technique a bénéficié de l'avènement de nouveaux capteurs. Les capteurs CCD refroidis présentent des caractéristiques parfaitement adaptées à la détection de signaux de fluorescence faible (sensibilité, dynamique, rapport signal sur bruit élevé) (Mason, 1993).

Les travaux menés en microscopie conventionnelle 3D ont été réalisés en collaboration avec le Dr D. Dumas du laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie de la Faculté de Médecine de Nancy (Pr J.F. Stoltz). Le système EPR<sup>TM</sup> System (IPLab-Scanalytics, Fairfax, VA) appelé aussi *Cellscan*, est un système qui permet de produire des images de fluorescence tridimensionnelle de haute résolution. Il se compose de divers éléments :

- d'un dispositif piézo-électrique et de son contrôleur permettant de réaliser des déplacements suivant l'axe z de focalisation d'un pas entre 0,1 et 100  $\mu$ m, avec une précision de 0,01  $\mu$ m.

- de la caméra CCD refroidie Sensys appropriée à l'acquisition de signaux de fluorescence,

- d'un shutter mécanique (contrôle du temps d'excitation),

- d'une unité de contrôle de l'acquisition des images.

Un logiciel permet de fixer le protocole d'acquisition des images. Des paramètres tels que le pas entre chaque plan, la course pour couvrir l'ensemble de l'échantillon, le temps d'intégration de la caméra peuvent être adaptés et modifiés pour chaque expérimentation.

Ce dispositif permet d'obtenir des coupes "optiques" (OSM) qui sont traitées, reconstruites, et enregistrées sous un format brut. Elles sont visualisées par des projections bidimensionnelles de l'échantillon. Le transducteur piézo-électrique du dispositif EPR<sup>TM</sup> a la particularité de s'adapter sur tout type de microscope droit ou inversé entre l'objectif et la tourelle porte-objectifs.

### 4.1.6.3. Microspectrofluorimétrie

La microspectrofluorimétrie est une technique qui combine : la microscopie, permettant la localisation du fluorochrome ; la spectroscopie, assurant l'analyse spectrale des signaux de fluorescence ; et la fluorimétrie afin de réaliser une mesure quantitative ou semi-quantitative. L'intérêt de cette technique consiste à pouvoir évaluer de façon non invasive pour l'échantillon biologique l'impact de l'environnement sur les caractéristiques spectrales ainsi que sa concentration.

Pour réaliser des mesures spectrales intracellulaires non invasives, une tête adaptatrice a été intégrée en sortie 1 du microscope afin de transmettre, par l'intermédiaire d'une fibre optique, la lumière de fluorescence vers le spectrographe. Le réglage de la tête sur le microscope, ainsi que la caractérisation de l'ensemble du dispositif ont fait l'objet de la thèse de doctorat de *JJ Padilla Ybarra* (Padilla Ybarra, 1999).

Chacune des sorties reçoit 100% de l'information lumineuse. Donc la tête adaptatrice (U-DPT-2, Olympus) a la propriété d'avoir deux sorties auxquelles sont adaptées d'une part une caméra couleur mono CCD (Cohu 8310 PAL/YC Solid-State CCD color Camera), d'autre part une fibre optique de mesure. Cette tête permet, en fonction de son positionnement, les deux modes d'observation suivants :

- La première position permet le positionnement précis de la fibre optique et l'acquisition de l'image de la zone de mesure (distribution 50%/50%).

- La seconde position assure le maximum d'intensité vers la fibre (100%) afin de privilégier la mesure des signaux de fluorescence.

La fibre optique permet d'effectuer une mesure spectrale sur un volume limité de l'échantillon. Le dispositif est conçu pour que la fibre ( $Ø_f$  100 µm) associée à l'objectif 100x (NA1,35) atteigne une résolution optimale. Ainsi la résolution spatiale dans le plan objet est de 0,303 µm. En outre la caractérisation instrumentale a établi que la zone de mesure spatiale correspond au diamètre cœur de mesure (Øzm = 1,8 µm), et que la zone de focalisation axiale est comparable à un *pinhole* (Padilla Ybarra, 1999).

# 4.2. Méthodes d'expérimentations en microscopie de fluorescence

Concernant les lignées cellulaires, les cellules sont ensemencées dans des flacons de culture de  $12,5 \text{ cm}^2$  à fond amovible, (*Slideflask*, Nunc<sup>TM</sup>, PloyLabo, Strasbourg, France). Ce support permet une observation sur cellules vivantes (ou fixées) tout en maintenant leur caractère adhérant (limitation de l'épaisseur de l'échantillon). Concernant les prélèvements leucémiques, après isolation de la suspension cellulaire, un échantillon est déposé sur une lamelle puis monté sur une lame porte objet, pour être observé.

Parmi les différents paragraphes, certaines méthodologies ne seront décrites que très succinctement puisqu'elles apparaîtront dans les deux articles intégrés dans le chapitre suivant (Bour-Dill et al., 2000, Merlin et al., 2000).

4.2.1. Distribution intracellulaire des anthracyclines et des marqueurs morphologiques

# 4.2.1.1. Objets de référence : billes fluorescentes

Différents lots de billes sont utilisés afin de contrôler les aberrations chromatiques de l'objectif ainsi que la linéarité en intensité. Les billes en solution dans leur milieu sont déposées sur la lamelle montée sur une lame porte objet et scellée avec du vernis afin d'éviter que le milieu ne s'évapore.

Les aberrations chromatiques sont contrôlées par la mesure du décalage de pixels sur les images obtenues en 2D pour les billes Dako<sup>TM</sup> (3,2  $\mu$ m, Dako, Trappes, France) montées dans de l'agar à 3%. Elles sont caractérisées par 2 pics d'excitation, dans l'ultra violet et le bleu, et 3 pics d'émission, 515 nm, 560 nm et 610 nm (Gramain, 2000). Chaque combinaison de filtres et d'objectifs utilisés dans l'application biologique sont testés. La linéarité détectée en niveaux de gris est contrôlée sur les images 2D obtenues pour les billes Inspeck <sup>TM</sup> (2,5  $\mu$ m,

Molecular Probes, Leiden, Hollande) montées dans du PBS. Ces billes, calibrées en intensité relative, ont un pic d'excitation à 490 nm et d'émission à 515 nm. Les méthodes d'analyse d'images et la mise en forme des données sont présentées pour les aberrations chromatiques dans l'article intégré dans le *Chapitre III*, paragraphe 2. de la PARTIE 1 des résultats (Bour-Dill et al., 2000) et pour la linéarité en intensité dans les travaux de *MP Gramain* (Gramain, 2000). Brièvement, les mesures sont réalisées respectivement par le pourcentage de recouvrement en pixels des images obtenues pour une même bille dans chaque configuration de filtre, et en intensité par la densité moyenne de niveaux de gris.

#### 4.2.1.2. Détermination des sites de séquestration

L'étude de séquestration intracellulaire des anthracyclines a été réalisée dans le cadre de l'analyse de la distribution de la daunorubicine (DNR) pour le couple MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup> ensemencées respectivement à 1 et 2.10<sup>4</sup> cellules/mL pendant 3 jours à 37°C. Une étude préliminaire en microscopie conventionnelle 2D, et 3D en *OSM* par le système

Cellscan, a été employée pour la distribution de la DNR au sein des deux lignées.

La technique de co-localisation 2D par microscopie en épifluorescence a été développée à visée qualitative et quantitative, en fonction de la distribution intracellulaire des fluorochromes étudiés. Cette technique a été choisie pour déterminer les sites de séquestration de la DNR mis en évidence pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. Elle rend impératif au préalable différents contrôles du système par analyse d'image (aberrations chromatiques, linéarité) et par dosimétrie (évaluation du photoblanchiment des fluorochromes au niveau intracellulaire pendant l'acquisition des images), ainsi qu'un travail important d'optimisation de paramètres instrumentaux et biologiques.

Ces différentes démarches sont présentées dans l'article intégré *Chapitre III*, paragraphe 2. de la PARTIE 1 des résultats (Bour-Dill et al., 2000). Elles incluent les conditions d'expérimentation de microscopie de fluorescence 2D et 3D, ainsi que la technique de co-localisation 2D impliquant les procédures de contrôle et d'optimisation, les méthodes d'analyse et de mise en forme des données.

# 4.2.1.3. Déconvolution 2D

Cette méthode numérique de restauration a été testée sur des images obtenues en épifluorescence conventionnelle 2D avec la lignée MCF-7 ayant incorporée la DNR à 2 µM

après des incubations de 15 min à 2 h 30 min à 37°C. L'acquisition des images est effectuée avec la configuration des filtres suivante (PB 460-490 nm/MD 570 nm/PH 590 nm). Le choix de l'algorithme de déconvolution s'est porté sur l'algorithme du *Maximum a posterori*. Il a été sélectionné après expérimentations sur des billes de référence fluorescentes permettant d'évaluer différents critères (qualité d'image, résistance au bruit, vitesse de convergence) qui sont présentés dans les travaux de *Gramain et al* (Gramain et al., 1997).

#### 4.2.1.4. Détermination des spectres au niveau intracellulaire

Les spectres d'émission de fluorescence de la DNR au niveau intracellulaire ont été calculés, après des mesures effectuées par microspectruorimétrie, pour la lignée MCF-7 et la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. La sélection de la zone de mesure intracellulaire est réalisée en mode conventionnel. Le positionnement de la zone de mesure est effectué en fonction de la position de la fibre, définie lors de la caractérisation du dispositif instrumental (Padilla Ybarra, 1999). Les spectres d'autofluorescence des régions cytoplasmiques et nucléaires ont été mesurés afin de les utiliser comme contrôles. Les lignées ont été incubées en présence de la DNR à 30 µM pendant 2 ou 24 h à 37°C. L'observation des cellules, après lavages au PBS, est réalisée sous une excitation atténuée par un fdn de 25% ainsi qu'avec une zone d'excitation limitée à la région d'intérêt par le diaphragme d'excitation. Ces conditions permettent de réduire le phénomène de photoblanchiment localement et de préserver l'ensemble du champ d'observation. Deux spectres séquentiels sont saisis et moyennés pour améliorer le rapport signal/bruit. L'acquisition d'un spectre s'effectue avec un temps d'intégration de 4 s. Les régions intracellulaires d'intérêt sont localisées au niveau cytoplasmique (Golgi/ périphérie de la membrane cytoplasmique) et nucléaire. Pour chaque région d'intérêt, 5 mesures de fluorescence sont réalisées et moyennées.

### 4.2.1.5. Modulation de la distribution intracellulaire

*Lignées cellulaires.* La modification de la distribution intracellulaire de la DNR induit par un chimiomodulateur seul ou combiné, a été évaluée pour le couple MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup>. Les modulateurs testés sont le S9788 (Servier) et le PSC-833 (Novartis). Ils sont co-incubés avec la DNR à 2  $\mu$ M pendant 2 h à 37°C. Les conditions d'application du S9788 et/ou du PSC-833 sont décrites dans l'article intégré dans le *chapitre III*, dans le paragraphe *6.1*. de la PARTIE 1 des résultats (Merlin et al., 2000). Après l'incubation, les cellules sont lavées puis

immédiatement observées. Les images présentées sont issues d'au moins 2 essais indépendants.

*Prélèvements leucémiques.* Les cellules recueillies à partir des prélèvements cliniques sont immédiatement incubées pendant 2 h à 37°C en présence de la DNR seule ou co-incubées avec le PSC-833 à 5  $\mu$ M. Après lavages au PBS de la suspension cellulaire, un volume de 12  $\mu$ L comprenant une concentration de 5.10<sup>6</sup> cellules/mL est déposé sur une lamelle puis monté sur une lame porte objet. Puis l'échantillon est observé immédiatement (<15 min).

Le critère évalué est le nombre de vésicules par cellule, marquées par la fluorescence de la DNR. La procédure consiste à effectuer un comptage cellule par cellule du nombre de vésicules intracellulaires, et ce sur plusieurs plans axiaux. Le comptage est effectué sur 3 préparations indépendantes. Les résultats représentent les valeurs moyennes du nombre de vésicules par cellule obtenu pour ces 3 comptages. Ce procédé permet de comparer le même échantillon incubé avec la DNR seule et co-incubé avec le PSC-833, ainsi que de comparer les cellules obtenues à partir de différents prélèvements leucémiques.

Pour ces applications, l'acquisition des images (2 ou 4 s d'intégration) obtenues pour la distribution de la DNR, se fait sous une excitation atténuée par un *fdn* de 25% et avec la configuration suivante des filtres (PB 460-490 nm/MD 570 nm/PH 590 nm).

#### 4.2.1.6. Distribution de la fluorescence des anthracyclines

Les anthracyclines étudiées sont l'épirubicine (EPI) et l'idarubicine (IDA). La comparaison de la distribution intracellulaire de leur fluorescence respective est réalisée pour le couple MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup>, ainsi que pour la lignée parentale A549 et ses dérivées résistantes A549 T<sub>3</sub> et A549 V<sub>3</sub>. Les cellules sont ensemencées pour le couple MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup> à 1 et 2.10<sup>4</sup> cellules/mL, alors que la lignée A549 parentale et ses dérivées sont ensemencées à  $1.10^4$  cellules/mL. Trois jours après l'ensemencement, l'incubation est effectuée pendant 2 h à 37°C respectivement aux concentrations de 2 et 0,5 µM pour l'EPI et l'IDA. Ces conditions permettent de concilier la détection de fluorescence et la viabilité cellulaire des différentes lignées. Après leur incubation, les cellules sont lavées au PBS, puis observées immédiatement avec la configuration des filtres suivante (PB460-490 nm/MD570 nm/PH590 nm). L'acquisition des images (4 s) se fait sous une excitation atténuée par un *fdn* de 25%.

Pour ces deux derniers paragraphes (4.2.1.5. Modulation de la distribution intracellulaire, et 4.2.1.6. Distribution ), l'observation est effectuée par microscopie en épifluorescence 2D

conventionnelle. Le temps d'intégration est déterminé par un compromis entre l'obtention d'image présentant une dynamique de niveaux de gris suffisante pour obtenir un bon rapport signal/bruit, et la limitation des phénomènes de photoblanchiment et d'échauffement local. La comparaison entre images est permise lorsque les conditions d'acquisition sont identiques ainsi que par la mise en forme des images effectuée sur la même échelle de niveaux de gris.

# 4.2.2. Détection du processus de mort cellulaire

Le processus de mort cellulaire induite par les anthracyclines est étudié pour le couple MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup>, ainsi que la lignée parentale A549 et ses dérivées résistantes A549 T<sub>3</sub> et A549 V<sub>3</sub>. L'évaluation est réalisée après 24 h d'incubation en présence d'anthracycline pour toutes les lignées, et 48 h plus tard pour le couple MCF-7 MCF-7<sup>DXR</sup>. Les cellules sont incubées en présence d'une IC<sub>50</sub>, d'IDA ou d'EPI, déterminée pour chaque lignée parentale et appliquée également aux lignées résistantes.

L'analyse morphologique est effectuée par un double marquage de l'ADN en microscopie en épifluorescence 2D conventionnelle. Le principe du double marquage consiste à détecter les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire par l'intermédiaire du marquage à l'iodure de propidium (IP), à 15  $\mu$ g/mL pendant 30 min à température ambiante et de suivre les modifications nucléaires de l'ensemble des cellules par le marquage vital à l'Hoechst 33342 à 5  $\mu$ g/mL pendant 30 min à température ambiante (Molecular Probes, Leiden, Hollande) (Li et al., 1996, Lizard et al., 1995). Les configurations des filtres utilisées sont respectivement pour l'IP (PB 460-490 nm/MD 570 nm/PH 590 nm), et le Hoechst 33342 (PB 330-385 nm/MD 400 nm/PB 420-460 nm).

L'analyse des images est effectuée par comptage de cellules en fonction d'une classification définie par des critères morphologiques. Les cellules sont classées "intactes" lorsque leur chromatine est interphasique ou mitotique. Les cellules apoptotiques sont classées selon différents aspects de l'ADN : chromatine condensée puis margination et apparition de corps apoptotiques. Les cellules sont classées "nécrotiques" lorsqu'elles sont marquées par l'IP associées à une morphologie "floculée" de la chromatine. Les cellules sont classées en "mort mitotique" lorsqu'elles présentent des aberrations mitotiques comme des cellules géantes multinucléées.

Les résultats sont issus de 3 expérimentations indépendantes comprenant une comparaison entre cellules traitées et cellules témoins non traitées par anthracycline. Chaque expérimentation comprend au moins 50 cellules provenant de différents champs d'observation.

#### 5. Spectrofluorimétrie

Les mesures d'absorbance (A) en cuve contenant une solution d'anthracycline (350-700 nm) ont été effectuées en utilisant un spectrophotomètre (Lamda Bio Perkin-Elmer, France). Les mesures de fluorescence en cuve, positionnée à 45° contenant une solution d'anthracycline (490-700 nm), ont été effectuées avec un spectrofluorimétre (LS50B, Perkin-Elmer). Les spectres de fluorescence sont enregistrés dans les mêmes conditions et corrigés pour les bruits dus aux instruments.

### 6. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique que nous avons retenue afin d'obtenir rapidement des données semi-quantitatives sur de grands échantillons cellulaires. Le cytomètre en flux Orthocyte® (Ortho Diagnostic Système, Roissy, France) est équipé d'une lampe à Xénon filtrée à 488 nm. L'analyse en fluorescence peut s'effectuer par l'intermédiaire d'un PB à l'émission de 530 ±15 nm et/ou d'un PH à 575 nm.

### 6.1. Immunomarquages

L'expression des protéines P-gp, MRP et LRP a été évaluée par immuno-marquages selon la méthode décrite pour la P-gp par *Merlin et al.* (Merlin et al., 1994) alors que la méthode pour MRP et LRP est adaptée selon *Flens et al.* (Flens et al., 1994). Ces techniques sont présentées dans l'article intégré dans le *Chapitre III :* paragraphe 2. de la PARTIE I des résultats (Bour-Dill et al., 2000). Brièvement, les anticorps (Ac) monoclonaux 4E3 (Dako), QCRL1 (Centocor, Malvern, PA) et LRP56 (Tebu, Le Plessy en Yvelines, France) ont été utilisés, puis la détection est effectuée par un anticorps secondaire couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Sigma). Un anticorps isotype IgG de contrôle est utilisé comme contrôle négatif. L'analyse s'effectue en terme de pourcentage de cellules marquées en tenant compte du contrôle non traité par l'anticorps primaire.

# 6.2. Accumulation et efflux des anthracyclines

L'évaluation de paramètres de pharmacologie cellulaire permet d'une part de comparer différentes anthacyclines au sein d'une même lignée, d'autre part pour la même anthracycline de comparer la lignée résistante à sa lignée parentale. En outre cela permet également de quantifier de façon relative l'efficacité inhibitrice des chimiomodulateurs.

Concernant les lignées cellulaires, les cellules sont ensemencées en plaques 6 puits. En phase exponentielle de croissance, elles sont incubées à  $37^{\circ}$ C en présence de l'anthracycline étudiée, associée ou non avec un chimiomodulateur. Après lavages au PBS, les cellules sont, soit remises en culture dans du milieu RPMI avec 9% SVF pour l'étude de l'efflux, soit directement trypsinées pour l'étude en accumulation. Après trypsination, les cellules sont centrifugées et lavées à froid au PBS, puis marquées à froid pendant 10 min par l'IP (50 µg/mL) afin de discriminer les cellules endommagées ou mortes. Le contrôle en fluorescence est effectué par la mesure en autofluorescence des cellules sans fluorochrome. Les mesures en fluorescence sont issues de la valeur médiane obtenue après amplification logarithmique relevée sur les histogrammes de la population cellulaire sélectionnée. Puis les valeurs sont converties en valeur linéaire d'intensité de fluorescence selon la relation :

$$F = 10^{(M_N \times \Delta C)}$$

*M* : nombre de module de l'amplificateur (3), *N* : nombre de canaux de détection (256),  $\Delta C$  : variation entre valeur médiane de fluorescence (cellules témoins/cellules cibles)

*L'accumulation intracellulaire* est mesurée pour la DNR et l'EPI à 2  $\mu$ M et pour l'IDA à 0,5  $\mu$ M. Ces concentrations permettent un bon compromis entre la viabilité cellulaire et le rapport signal/bruit. La même concentration cellulaire a été utilisée pour les lignées parentales et leur dérivée résistante afin d'évaluer le caractère fonctionnel des pompes à efflux. La cinétique d'incorporation des lignées parentales a permis de sélectionner le temps de 2 h correspondant au plateau d'accumulation des anthracyclines.

L'effet des modulateurs est mesuré après une co-incubation avec la DNR. L'analyse peut être réalisée, après linéarisation des valeurs obtenues en fluorescence, par normalisation des valeurs entre les cellules résistantes et cellules sensibles. Les conditions expérimentales et la méthode pour calculer la modulation de l'accumulation initiale sont décrites dans l'article intégré dans le *chapitre III*, dans le paragraphe 6.1. de la PARTIE 1 des résultats (Merlin et al., 2000).

*L'analyse de l'efflux* a été effectuée pour l'EPI et l'IDA respectivement à 2 et 0,5  $\mu$ M pour les 5 lignées cellulaires. Après 2 h de contact, les cellules sont lavées au PBS, puis remises en

culture à 37°C afin de révéler l'évolution de la rétention cellulaire au cours du temps (0,5 ; 2 ; 4 ; 8 ; 15 et 24 h après le lavage). Les valeurs d'intensité de fluorescence sont linéarisées, puis rapportées à la valeur obtenue après 2 h de contact.

Pour chacun de ces procédés, les mesures ont été effectuées sur au moins 5000 cellules et les résultats issus d'au moins 3 expérimentations indépendantes.

#### 6.3. Détection du pic sub- $G_1$

Cette technique permet de détecter simultanément, par analyse du contenu cellulaire en ADN, le phénomène d'apoptose et la distribution dans le cycle cellulaire. Cette méthode consiste à fixer et perméabiliser les cellules pour en extraire les fragments d'ADN dégradé, puis à marquer l'ADN restant. Le marquage de l'ADN est effectué par l'intermédiaire d'un intercalant fluorescent, l'iodure de propidium (IP). La fluorescence étant proportionnelle au contenu en ADN, celle issue des cellules apoptotiques est plus faible que celle issue des cellules intactes (apparition du *pic sub-G*<sub>1</sub>). Le protocole employé est inspiré de l'étude comparative de techniques de détection en fluorescence des cellules apoptotiques de *Li et al.* (Li et al., 1996).

Les 5 lignées cellulaires ont été évaluées après un traitement à l'EPI ou l'IDA. Les cellules sont évaluées en phase exponentielle de croissance. Les anthracyclines ont été ajoutées au milieu de culture des 5 lignées pendant 24 h. Les cellules sont exposées à l'IC<sub>50</sub> ainsi qu'à  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> et l'IC<sub>50</sub>x10 déterminées pour les cellules parentales, mais qui sont appliquées à leurs dérivées résistantes. La cinétique d'induction d'apoptose a été évaluée pour les points de mesures suivants : 8 et 24 h d'exposition à l'anthracycline, puis 24 et 48 h après avoir éliminé l'anthracycline. A chaque point correspond un contrôle effectué pour des cellules non traitées. Après incubation à 37°C avec les anthracyclines, le surnageant est récupéré, puis les cellules sont lavées au PBS froid et décollées par un grattoir. Une suspension cellulaire de 1.10<sup>6</sup> cellules est fixée par l'éthanol absolu à 4°C. Après 5 min de centrifugation à 1500 rpm (300 g) et lavage à froid, le culot est remis en suspension dans de l'éthanol à 70% (v/v) froid pendant au moins 30 min Après lavage, le culot est remis en suspension dans du PBS pendant 2 h à température ambiante afin de permettre l'élution des fragments d'ADN. Après lavage, les cellules sont colorées par un tampon de coloration composé de : Triton 0,1%, IP à 50 µg/mL, RNase à 25 µg/mL (Boehringer, Manheim, Allemagne), EDTA à 0,1 mM.

Les données sont analysées à l'aide du logiciel Multi 2D (Phoenix Flow systems, San Diego, USA). L'analyse est effectuée en terme de distribution cellulaire d'une part dans le cycle

cellulaire et d'autre part dans la région sub- $G_1$ . Les résultats, issus de 3 expérimentations indépendantes, s'expriment en pourcentage de cellules distribuées dans la région d'intérêt par rapport à un contrôle cellulaire non traité.

#### 7. Evaluation d'éléments radio marqués

### 7.1. Incorporation de daunorubicine tritiée

L'accumulation intracellulaire totale et nucléaire de DNR tritiée ([<sup>3</sup>H]-DNR, Sigma) a été déterminée pour le couple MCF-7 / MCF-7<sup>DXR</sup> selon la méthode de *Merlin et al.* (Merlin et al., 1994) et adaptée pour les travaux présentés dans l'article intégré *Chapitre III*, paragraphe 2. de la PARTIE 1 des résultats (Bour-Dill et al., 2000). Brièvement, les cellules mises en suspension sont incubées en présence de 2  $\mu$ M de [<sup>3</sup>H]-DNR pendant 2 h à 37°C. Les cellules sont lysées à froid dans une solution contenant 0,01 mol/L Tris-HCl (pH7,6) et centrifugées. Le cytosol et les noyaux sont récupérés pour être dilués dans un liquide à scintillation (Ready Safe, Beckman) et comptés en radioactivité (LS1800 counter, Beckman).

# 7.2. Métabolisme d'acide palmitique

L'incorporation d'acide palmitique tritié ([<sup>3</sup>H]-Pal) permet après lyse et extraction des lipides cellulaires de mesurer différents composants lipidiques (DAG, céramides, sphingomyéline) récupérés après migration en chromatographie sur couche mince (CCM). L'évaluation est effectuée, après ajout de liquide à scintillation, par comptage radioactif.

L'évaluation a été effectuée sur les deux lignées parentales MCF-7 et A549 pour l'EPI et l'IDA. Les cellules ont été traitées à l'IC<sub>50</sub> pour un contact total de 24 h. La cinétique comprend les points de contact avec l'anthracycline suivants : 5, 15, 40, et 60 min, puis 4, 8 et 24 h. Les contrôles de cellules non traitées comprennent les points suivants : 1, 4 et 24 h. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'unité INSERM E9910 de l'Institut Claudius Regaud, de Toulouse selon le protocole décrit par *Jaffrezou et al.* (Jaffrezou et al., 1996).

Les cellules sont cultivées en flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup> en présence d'élément [<sup>3</sup>H]-Pal  $((9.10(n))^{-3}H)$  Palmitic acid ; Specific 1,93 TBq/mmol : 53 Ci/mmol, Amersham Life Science) à raison de 0,5 µCi/mL durant 48 h. Les cellules sont alors lavées, puis incubées en présence d'anthracycline. A chaque point de mesure les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir à 4°C et 1.10<sup>6</sup> cellules en suspension sont centrifugées à 10 000 rpm à froid. Le culot est récupéré, séché et la réaction est stoppée par immersion des échantillons dans de l'azote.

Brièvement, une première extraction de la phase lipidique est réalisée grâce à 2,5 mL de solution de chloroforme/méthanol (v/v ; 2/1). Après avoir vortexé et homogénéisé, les cellules sont centrifugées (2500 rpm) pendant 10 min, puis la phase chloroformée inférieure est récupérée. Une seconde extraction est effectuée par 0,850 mL de solvant chloroforme/méthanol/eau (3/48/47). Après avoir vortexé et homogénéisé, les cellules sont centrifugées, puis la phase chloroformée est récupérée et asséchée.

Le culot est repris par 50  $\mu$ L de solution choloroforme/méthanol (v/v ; 2/1) puis chaque point de mesure est déposé sur une plaque de silice 60 (Merck KgaA, Darmstad, Allemagne). Des témoins froids des composants à mesurer sont déposés : DAG (10 mM dilué dans du chloroforme/méthanol, v/v ; 2/1, Sigma), céramideIII (10 mM dans du chloroforme/méthanol, v/v ; 2/1, Sigma). Une première migration verticale est réalisée dans un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique/acide formique/eau ( v/v ; 65/30/10/4/2) pendant 40 min Après séchage, une seconde migration est effectuée en cuve verticale dans un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique (v/v ; 95/5/5) jusqu'en haut de la plaque. Après séchage, la plaque est colorée par de l'iode sublimé pendant 30 à 60 s. Après avoir mis en évidence les différents composés, les produits sont grattés et récupérés, puis toute la colonne de migration est également récupérée pour être quantifiée en radioactivité. Le pourcentage de chaque lipide radioactif est rapporté par rapport aux lipides radioactifs totaux.

# 8. Evaluation relative d'ARNm de gènes d'intérêt par RT-PCR semi-quantitative

La détection des gènes d'intérêt est effectuée par l'évaluation relative des produits d'amplification d'ADNc obtenus par transcription inverse d'ARN extraits par rapport à un gène de référence.

### 8.1. Extraction d'ARN

Les 5 lignées cellulaires ensemencées en flacon de 75 cm<sup>2</sup> de 0,7 à 1,4.10<sup>4</sup> cellules/mL, sont mises en contact avec l'EPI ou l'IDA en phase exponentielle de croissance. L'IC<sub>50</sub> déterminée pour les lignées parentales est également appliquée à leurs dérivés résistantes. A chaque temps de contact 0, 1, 4, 8, 24 h avec l'anthracycline puis 24 h après l'élimination de l'anthracycline, les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir.

Les ARN totaux (ARNtx) sont extraits selon la méthode de *Chomczynski et Sacchi* (Chomczynski et Sacchi, 1987). Brièvement, 10<sup>6</sup> cellules sont mises en contact avec 1 ml de TRIzol<sup>TM</sup> (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) qui est un mélange de phénol et

d'isothiocyanate de guanidium. La solution est homogénéisée, laissée 5 min à température ambiante puis centrifugée 15 min à 12 000 g et 4°C pour éliminer les débris dus à la lyse cellulaire. Au surnageant transféré dans un autre tube, est ajouté 0,2 mL de chloroforme pour précipiter les protéines. Après 15 min de centrifugation à 12 000 g et 4°C, la phase supérieure contenant les ARN totaux est prélevée sans toucher à l'interface protéique. Ceux-ci sont ensuite précipités par ajout d'isopropanol en volume équivalent puis laissés 10 min à température ambiante, et centrifugés 10 min à 12 000 g et 4°C. Le culot récupéré est lavé à l'éthanol à 70% suivi de 5 min de centrifugation à 7 500 g et 4°C. Le culot d'ARN mis à sécher dans un bain sec à 37°C est dissous dans 50 µL d'eau.

La quantité et la qualité des ARNtx extraits sont analysées par la mesure du rapport d'absorbance entre 260 et 280 nm d'un aliquot de la solution d'ARN dilué 200 fois dans l'eau. La pureté est analysée par migration de 0,5-1 µg d'ARNtx sur un gel d'agarose à 1%. Deux bandes correspondant aux ARN ribosomiques 18S et 28S sont visibles. Une contamination en ADN est caractérisée par la présence d'une bande de bruit (*smear*) au niveau des puits.

# 8.2. Transcription inverse

L'amplification des gènes d'intérêt et du gène de référence, est réalisée par une transcription inverse non dirigée. La synthèse des ADNc est effectuée avec 1 µg d'ARNtx qui sont dénaturés en présence de 500 ng d'amorces aléatoires (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) dans un volume réactionnel de 11 µL pendant 10 min à 70°C puis placés à 4°C. Ce volume est complété à 20 µL avec du tampon Tris-HCl 50 mmol/L à pH 8,3, KCl 75 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/L, désoxynucleotides triphosphate 0,5 mmol/L (Pharmacia Biotech, Orsay, France), dithiothréitol 10 mmol/L (Life Technologies) et 200 unités de transcriptase inverse Superscript II® (Life Technologies). Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante puis 50 min à 42°C, suivi par 15 min à 70°C. La superscript II est une enzyme recombinante qui n'a plus d'activité RNase, donc 2,5 unités de RNase H (Life Technologies) sont ajoutées dans les échantillons qui sont incubés pendant 20 min à 37°C puis conservés à -20°C/-80°C.

## 8.3. PCR semi-quantitative

Les amplifications sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur Crocodile II (Appligene, Strasbourg, France). La RT-PCR semi-quantitative fait appel à une co-amplification du gène d'intérêt et du gène de référence. Les interactions et les compétitions rendent donc nécessaires l'optimisation des conditions d'amplification. Cinq paramètres sont à prendre en compte dans l'ordre suivant : la température d'appariement (51 à 59°C), la concentration en MgCl<sub>2</sub> (0,5 à 2,5 mM), le ratio d'amorces intérêt/référence (0,5/1, 1,5/1, 2/1, 1/1, 1/0,5, 1/1,5, 1/2), le nombre de cycles d'amplification (20 à 40 cycles) et la quantité d'ADNc (0,5 à 5  $\mu$ L). Les deux premiers paramètres sont optimisés sans co-amplification, puis les suivants sont évalués en co-amplification. Les paramètres optimisés pour la co-amplification gène d'intérêt/référence sont résumés dans le *Tableau* 7. Les ratio et les quantités d'ADNc ne sont pas indiqués car leurs valeurs sont toutes de 1/1 et de 2  $\mu$ L (0,5  $\mu$ M) pour toutes les amplifications. Les produits des gènes p53 (Aguilar-Santelises et al., 1996), mdr1 (Noonan et al., 1990), mrp1 (Bordow et al., 1994), des topoisomérases II  $\alpha$  et  $\beta$  sont analysés en fonction d'un gène de référence *gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase) (Tso et al., 1985) et/ou de  $\beta_2$ - $\mu g$  ( $\beta_2$ -microglobuline) (Gussow et al., 1987). Toutes les amorces sont fournies par Gibco (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France).

Les PCR débutent par un cycle de 3 min de dénaturation à 94°C, 1 min à la température d'appariement optimisée et 1 min de synthèse à 72°C, puis les cycles d'amplification, [dénaturation/appariement/synthèse, 1 min à chaque étape] dont le nombre est optimisé, et se termine par 7 ou 10 min (p53 ou mdr1/mrp1/topoII  $\alpha$  et  $\beta$ ) de synthèse à 72°C.

Gènes	MgCl <sub>2</sub>	T°C app.	Cycles amplif.	Amorces (Sens / Antisens)
p53 <sup>1</sup>	1,25 mM	56°C	27	5' TCT GTG ACT TGC ACG TAC TC 3'
•				5' CAC GGA TCT GAA GGG TGA AA 3'
mdr1 <sup>1,2</sup>	1,5 mM	57°C	26	5' CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG 3'
				5' GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA 3'
mro1 <sup>1,2</sup>	1,5 mM	57°C	26	5' TCT CTC CCG ACA TGA CCG AGG 3'
p -				5' CCA GGA ATA TGC CCC GAC TTC 3'
gapdh	#	#	#	5' TGG GGA AGG TGA AGG TGG GA 3'
<i>.</i>				5' GAA GGG GTC ATT GAT GGC AA 3'
$\beta_2$ -µg	#	#	#	5' ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA 3'
,,,,				5' ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG 3'
topoII $\alpha^2$	1,5 mM	58°C	27	5' TTT AAG GCC CAA GTC CAG TTA AAC A 5'
				5' ATA AAT TCC AGA AAA CGA TGT CG 5'
topoIIβ <sup>2</sup>	1,5 mM	58°C	27	5' GAA GTG TTC ATC AGT AAA ATA CAG T 3'
1	·			5' CAT AAT CTT TCC ATA GCG TAA CGT T 3'

Tableau 7 : Résumé des paramètres optimisés pour la co-amplification des gènes d'intérêt/référence

<sup>1</sup>co-amplification du gène d'intérêt avec la *gapdh*. <sup>2</sup>co-amplification du gène d'intérêt avec la  $\beta_2$ - $\mu g$ . # : les conditions optimales de co-amplifications sont fonction du gène d'intérêt associé au gène de référence.

Concernant le gène p53, le fragment de 640 pb nécessite une variante de la PCR au niveau des températures des étapes précédant les cycles d'amplification pour réduire la synthèse de

produits non spécifiques (compétition avec le gène de référence et désappariemment accru). Cela consiste à effectuer une PCR impliquant 5 cycles précédents les cycles d'amplification à des températures plus stringentes pour les étapes de dénaturation (1 cycle à 95°C et 4 cycles à 93,5°C) et d'appariement (dégressif par 1°C de 61 à 56°C). La comparaison des produits d'amplification obtenus en PCR "classique" et "*Touch down*" est présentée dans la *Figure 15*.



Figure 15 : Comparaison des produits d'amplification sur un même gel de migration et pour les mêmes ADNc (p53/gapdh) obtenus pour différents nombres de cycles d'amplification en PCR "classique" et "*Touch down*"

# 8.4. Analyse des produits de PCR

Un gel d'agarose est préparé dans un tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) (Life Technology) dans de l'eau stérile, apyrogène exempte de DNase et RNase (Fresenius France Pharma, Sévres, France). Avant la polymérisation du gel, du bromure d'éthidium à 1 mg/mL est incorporé au gel afin de permettre la visualisation des acides nucléiques. Un tampon de dépôt est ajouté aux produits de PCR, puis sont déposés sur le gel. Les produits d'amplification du gène de référence *gapdh* (110 pb) ou  $\beta_2$ - $\mu g$  (120 pb) et du gène d'intérêt tel que le gène p53 (680 paires de bases (pb)), sont déposés sur un gel à 1% préparé avec du TBE 0,5x, ou à 2% pour les topoII $\alpha$  (473 pb) et  $\beta$  (337 pb) (Life Technology, Cergy-Pontoise, France) et également 2% pour mdr1 (157 pb) ou mrp1 (140 pb) (Métaphor® Agar, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) préparé avec du TBE 1x. Les produits de PCR sont alors séparés par électrophorèse dans un champ électrique de 100 V respectivement pendant 1 h 45 min, 2 h et 1 h selon la taille des fragments amplifiés.

Un système d'analyse d'image Gel-Doc 1000 (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France) est utilisé pour visualiser et analyser les produits d'amplification par trans-illumination en ultra violet à 302 nm. L'analyse densitométrique est réalisée sur l'image du gel acquise par l'intermédiaire d'une caméra. Pour chaque échantillon, le ratio d'expression relatif (**RER**) est calculé au moins en duplicata et représente la densité moyenne du gène d'intérêt par rapport à celle du gène de

référence. Les résultats présentés sont la moyenne avec l'écart-type de 3 expérimentations indépendantes.

# 9. Analyse de l'expression des protéines par Western-blot

### 9.1. Principe expérimental

La détection des protéines d'intérêt est réalisée par immuno-blot. Il s'agit de transférer sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) les protéines séparées sur un gel de polyacrylamide. La protéine cible est alors détectée par un anticorps spécifique qui lui-même est mis en évidence par une réaction immuno-colorimétrique.

# 9.2. Extraction et dosage des protéines

L'extraction des protéines est réalisée à 4°C et en présence d'antiprotéases (Sigma, St Quentin-Fallavier, France) pour éviter leur dégradation. Les 5 lignées cellulaires ensemencées en flacon de 75 cm<sup>2</sup> entre 0,7 à 1,4.10<sup>4</sup> cellules/mL selon les lignées, sont cultivées pendant 3 jours, puis mises en contact avec l'EPI ou l'IDA en phase exponentielle de croissance. La durée du contact est de 24 h à l'IC<sub>50</sub> déterminée pour les lignées parentales et appliquée à leurs dérivées résistantes. A chaque temps de la cinétique (0, 1, 4, 8, et 24 h durant l'exposition), les cellules sont lavées avec du PBS froid, puis décollées à l'aide d'un grattoir à 4°C. Environ 10<sup>6</sup> cellules sont centrifugées 5 min à 1500 rpm (300 g) et 4°C, puis le culot cellulaire sec est congelé à -20°/-80°C jusqu'à extraction des protéines. Les cellules sont mises en contact avec 200 µL de tampon de lyse froid (*Tableau 8*) additionné de 2 µL de Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (PMSF 5 mg/mL, Leupeptine, 0,1 mg/mL, Soybean tryp I 1 mg/mL, Aprotinine 0,1 mg/mL, TPCK 1 mg/mL) (Sigma) et sont régulièrement agitées pendant 60 min en gardant la solution à 4°C. Après 15 min de centrifugation à 10 000 g à 4°C, le surnageant est prélevé et conservé à -20/-80°C jusqu'à utilisation.

Le dosage des protéines est réalisé avec le kit Bio-Rad (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France) basé sur la méthode de *Bradford*. Dans une plaque 96 puits une gamme de standard BSA est déposée en duplicate de 0 à 1,4 mg/mL. Les échantillons, déposés de façon identique à la gamme, sont dosés pour une dilution au 1/5 et au 1/10. Après coloration, la lecture des absorbances est réalisée à 690 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Titertek Multiskan®

MCC/340 (Flow Laboratories). La concentration en protéines est estimée en reportant la valeur de la moyenne des 2 absorbances des échantillons sur la courbe étalon.

RIPA équilibré à pH 8 (qsp 100 mL)	Concentration	Quantité
NaCl	100 mM	0,58 g
TRIS	20 mM	0,24 g
Triton 100x	1%	1 mL
Na-désoxycholate	0,5%	0,5 g
SDS	0,1%	4 mL
Na EDTA	1 mM	0,033 g

Tableau 8 : Composition du tampon RIPA.

# 9.3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide

Les gels sont réalisés à l'aide d'un système Mini-Protean II (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France). La séparation des protéines est effectuée par migration sur gel discontinu dénaturant. La première phase de migration se fait sur un gel de concentration (*stacking*), et la seconde phase sur un gel de séparation (*run*). Les propriétés de séparation du gel varient selon le degré de réticulation du gel ainsi que de sa concentration. Ici, seule la concentration du mélange acrylamide/bisacrylamide 19:1(Life Technology, Cergy-Pontoise, France) varie en fonction de la protéine à mettre en évidence. Le *Tableau 9* indique la composition des différents gels utilisés pour la préparation de 2 gels de chaque. La distance de migration optimale se situe au milieu du gel, donc la concentration en polyacrylamide a été ajustée en fonction du poids moléculaire des protéines P53 (53 kDa), Bax (26 kDa) à détecter. Ces concentrations pour les gels *stacking/run* sont respectivement de 5/10%(P53), et 5/12,5% (Bax).

Tableau 9 : Composition des gels de séparation (run, R) et de concentration (stacking, STK).

R(12 mL) / STK (8 mL)	10%	12,5%	5%
Acrylamide-Bis 19:1 (mL)	3	3,6	1
$H_2O(mL)$	4,6	4	4,8
TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8 (mL)	3	3	Ø
TRIS-HCl 0,75 M pH 6,8 (mL)	Ø	Ø	2
Glycérol 50% (mL)	1,2	1,2	0,8
SDS 25% (µL)	120	120	80
Ammonium Persulfate 10% (µL)	100	100	100
TEMED (μL)	10	10	10

### 9.4. Traitements des échantillons

Les aliquots sont décongelés, et 10 ou 20  $\mu$ g de protéines sont prélevés puis complétés à 10  $\mu$ L avec du tampon de lyse RIPA. Un volume (10  $\mu$ L) de tampon de Laemli 1X avec 5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma) est ajouté aux 10  $\mu$ L d'échantillon. Les protéines sont dénaturées à

95°C pendant 5 min puis les tubes sont immédiatement placés à 4°C pour éviter un repliement des protéines. Les échantillons sont alors déposés sur le gel, puis mis à migrer à 100 V de 2 h dans un tampon tris-glycine-SDS (TGS : Tris 25 mM, Glycine, 192 mM, SDS, 0,1%; m/v) à pH 8,3 (Bio Rad). Dix  $\mu$ L d'un marqueur de poids moléculaire (Bio Rad) sont également déposés ainsi qu'un extrait cellulaire constituant un témoin positif exprimant la protéine à détecter.

# 9.5. Transfert

La membrane PVDF est activée dans du méthanol pendant 30 s puis rincée dans de l'eau pendant 2 min La membrane ainsi que le gel sont alors équilibrés dans du tampon de transfert lx (*Tableau 10*) (Bio Rad) pendant 15 min La porosité de la membrane PVDF est choisie en fonction du poids moléculaire de la protéine. Ainsi, la détection de P53 s'effectue sur une membrane 0,45  $\mu$ m (Millipore, Bedford, USA) alors qu'une porosité de 0,2  $\mu$ m (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France) est nécessaire pour Bax.

Tableau 10 : Composition des tampons de transfert

Composants	Tampon transfer	rt 10x (qsp 1L)	Composants	Tampon transfert 1x (qsp 1L)	
-	Concentration	Quantité		Quantité	
Tris	480 mM	58,2 g	Tampon 10x (mL)	100	
Glycine	390 mM	29,3 g	Méthanol (mL)	200	
SDS 25 %	0,375% (m/v)	15 mL	$H_2O(mL)$	700	

Le transfert s'effectue avec un blotter Trans-Blot SD Cell (Bio Rad). Les éléments sont disposés dans l'ordre suivant : un papier filtre (Bio Rad) humidifié avec du tampon de transfert, la membrane PVDF traitée, le gel, un second papier filtre humecté de tampon de transfert. Le transfert est réalisé à 40 mA par membrane pendant 20 min (Bax) ou 60 min (P53).

Afin de vérifier la qualité du transfert, la membrane est colorée pendant 3 min dans du rouge Ponceau 0,1% dans 5% d'acide acétique glacial (Sigma) puis lavée à l'eau distillée. Cette coloration n'altère pas la détection des protéines par les anticorps.

# 9.6. Marquage

Avant de procéder au marquage, la membrane est saturée pour éviter les fixations aspécifiques. Pour cela, la membrane est agitée pendant 1 h à température ambiante dans un tampon NaCl-Tris-Tween (TBST) à pH 7,5 auquel est ajouté un mélange de protéines. Il s'agit généralement de BSA (Sigma) ou de lait (Régilait écrémé).

L'incubation de la membrane avec l'anticorps primaire est effectuée toute la nuit à 4°C dans le tampon de saturation. La membrane est rincée rapidement dans du TBST, puis lavée 3 fois pendant 10 min sous agitation à température ambiante. La même procédure est appliquée pour l'incubation avec l'anticorps secondaire (le marquage est réalisé pendant 1 h à température ambiante). Un dernier lavage est réalisé avec du TBS seul pour éviter des interactions entre le Tween et les produits de révélation. Les conditions de détection des protéines sont résumées sur le *Tableau 11*.

Tableau 11 : Conditions de détection des protéines d'intérêt

Protéine	Membrane	Saturation	AcI	Dilution	AcII	Dilution
P53	0,45 μm	BSA 2% Lait 0,5%	DO7 (Dako, France)	1/5000	P0260 (Dako)	1/5000
Bax	0 <b>,22</b> μm	BSA 2% Lait 1%	Bax N-20-G (Tebu, France)	1/2000	P0399 (Dako)	1/2000

# 9.7. Révélation

Un kit de chimiluminescence ECL (Amersham, Les Ulis, France) repose sur l'émission de lumière à partir du luminol qui est un substrat de la peroxidase (HRP) couplée aux anticorps secondaires. Après avoir déposée la solution de révélation pendant 1 min, la membrane est séchée, puis entourée de Saran et placée sur un film photographique (Amersham, Les Ulis, France) pour être révélée.

# 10. Statistiques

Les tests statistiques utilisés sont les tests non paramétriques non appariés de comparaison de Mann-Whitney. Le seuil limite de significativité est de 5% (p<0,05).

# **III RESULTATS**

### **PARTIE 1: DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DAUNORUBICINE**

#### 1. Introduction générale

Les expérimentations présentées dans cette partie ont pour objectifs principaux la caractérisation et la modulation *in vitro* de la distribution intracellulaire de la daunorubicine (DNR), puis l'application de certains critères d'évaluation pour des prélèvements cliniques.

Notre approche *in vitro* est réalisée pour le couple de lignées cellulaires MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup>. L'identification rationnelle de(s) site(s) de séquestration, a été évaluée par une méthode de double marquage en microscopie conventionnelle 2D à épifluorescence, associée à une procédure de traitement et d'analyse d'images par des outils classiques d'imagerie. La microscopie de fluorescence conventionnelle présente comme inconvénient de former des images contaminées par le bruit issu des plans hors focalisation. C'est pourquoi après avoir évalué plusieurs algorithmes de déconvolution, l'algorithme sélectionné a été appliqué à des images provenant de la lignée MCF-7 ayant incorporée la DNR. Par suite, nous avons mesuré des spectres afin de comparer la configuration moléculaire de la DNR dans le compartiment cytoplasmique des deux lignées cellulaires MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup>. L'inhibition de la glycoprotéine-P (P-gp) est évaluée pour le S9788 et le PSC-833 incubés, seuls ou combinés, de façon concomitante avec la DNR. L'effet des modulateurs est mesuré principalement par rapport à l'accumulation, la distribution et la cytotoxicité de la DNR.

L'application clinique consiste à évaluer sur des prélèvements leucémiques différents paramètres mesurés *in vitro*.

La modulation de l'accumulation intracellulaire de la DNR par le PSC-833 et la CSA a été mesurée simultanément avec l'immunomarquage de la P-gp par cytométrie en flux, pour des prélèvements de patients adultes présentant une leucémie aiguë myéloblastique (LAM). La distribution subcellulaire de la DNR a été évaluée par microscopie de fluorescence pour des prélèvements de LAM d'adultes et de leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) d'enfants. La caractérisation de ces prélèvements est complétée par des caractéristiques cliniques (âge, réponse clinique, caractère cytopathologique) ainsi que par des critères biologiques.

#### 2. Détermination des sites de séquestration cytoplasmique de la daunorubicine in vitro

L'ensemble des méthodes ainsi que les résultats obtenus dans cette problématique ont fait l'objet d'une publication (Bour-Dill et al., 2000), qui est intégrée dans les pages suivantes. Les travaux menés en microscopie conventionnelle 3D ont été réalisés avec le Dr D. Dumas, du laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie, Nancy (Pr J.F. Stoltz).

BUT: ces travaux ont pour objet la caractérisation des mécanismes d'efflux et de séquestration de la daunorubicine (DNR) pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>, une sous-lignée résistante de la lignée MCF-7.

*RESULTATS* : l'expression de la P-gp, MRP et LRP a été évaluée pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. Seule la P-gp est surexprimée pour cette lignée. La quantification de DNR tritiée montre l'activité de la P-gp par la réduction intracellulaire de DNR, et met en évidence une altération de sa distribution subcellulaire. L'altération de distribution intracellulaire de la DNR se traduit en microscopie de fluorescence par sa séquestration cytoplasmique. Afin de déterminer les *sites de séquestration* pour la MCF-7<sup>DXR</sup>, une technique de double marquage en microscopie 2D conventionnelle a été envisagée. Après s'être assuré que les conditions étaient réunies pour pouvoir effectuer cette approche, des contrôles du dispositif expérimental ont été réalisés. La phase suivante a consisté à optimiser les procédures de marquage et d'analyse d'images. Cette méthode permet de quantifier le *degré de co-localisation* de deux marqueurs, ayant une distribution limitée dans le plan axial. Ainsi, *la contribution des vésicules de l'appareil de Golgi (65%)* a été démontrée dans la séquestration cytoplasmique de la DNR pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. Ces différents mécanismes de résistance associés au phénotype MDR classique altèrent l'efficacité cytotoxique de la DNR, expliquant partiellement la résistance à l'induction d'apoptose.

*CONCLUSIONS* : associé à l'efflux d'anthracycline par la surexpression exclusive de la P-gp, le phénotype de résistance à la DNR pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> se caractérise par la séquestration cytoplasmique de la DNR dans des vésicules appartenant à l'appareil de Golgi, ainsi que par la résistance à l'induction d'apoptose.

#### 3. Evaluation semi-quantitative et qualitative de l'impact de la déconvolution 2D in vitro

L'ensemble des résultats obtenus dans cette problématique ont fait l'objet d'une publication (Gramain et al., 1997), qui est intégrée en *Annexes*. Ce travail a été effectué en collaboration avec *M.P. Gramain*, dans le cadre de sa thèse de doctorat (Gramain, 2000), ainsi qu'avec le laboratoire d'Electronique (*LabEL*) de l'Université de Haute-Alsace de Mulhouse.

Afin d'améliorer la résolution des images obtenues par microscopie de fluorescence 2D conventionnelle, un algorithme a été appliqué sur les images issues d'échantillons biologiques.

L'implantation d'un algorithme nécessite d'abord la mesure de la réponse impulsionnelle propre au dispositif instrumental, puis son intégration dans l'algorithme (Gramain et al., 1997). Différents algorithmes ont été évalués sur des images 2D de référence obtenues par l'intermédiaire de *billes fluorescentes*. Les algorithmes ont été testés et comparés selon les critères suivants : la qualité de l'image, la robustesse au bruit et la vitesse de convergence. Finalement, l'algorithme du *Maximum a posteriori (MAP)* permet d'obtenir le meilleur compromis pour l'ensemble de ces critères de sélection (Gramain et al., 1997). Il a donc été appliqué sur des images obtenues pour la lignée MCF-7 ayant incorporée la DNR. L'effet de la déconvolution sur les images a été évalué par des *critères quantitatifs et qualitatifs*.

# 3.1. Analyses semi-quantitatives

L'algorithme de déconvolution du *MAP* a été appliqué sur les images obtenues pour la lignée MCF-7 après 10 ou 20 itérations, dont le nombre a été déterminé par le caractère convergent et constant de l'erreur quadratique (Gramain et al., 1997).

Les analyses semi-quantitatives ont pour objectif d'étudier l'impact de la déconvolution sur les niveaux de gris d'une image, relevés par l'intermédiaire des densités moyennes. Les différents points de mesures obtenus pour les images de microscopie de fluorescence sont comparés à ceux obtenus en cytométrie de flux, une technique de référence en fluorescence.

L'algorithme MAP a été dans un premier temps testé sur des billes calibrées en intensité (InSpeck<sup>TM</sup>) respectivement à 0,5, 1, 3, 10, 30 et 100%. Les courbes obtenues par cytométrie de flux, ainsi que les courbes obtenues par microscopie de fluorescence avant et après déconvolution, sont proches de la courbe théorique (données non présentées).

Puis l'incorporation de la DNR à 2  $\mu$ M pendant 2 h à 37°C, a été analysée en microscopie et cytométrie en flux pour différents temps d'incorporation : 15, 30, 60, 90, 120 et 180 min. Les écarts-types en cytométrie en flux sont réduits du fait de l'analyse d'un échantillon important (5000 cellules par point de mesure) par rapport à la microscopie de fluorescence (15-30 cellules par point de mesure). Toutefois, les résultats obtenus par cytométrie en flux sont comparables (Mann-Whitney) à ceux obtenus par analyse d'image avant déconvolution (p = 0,297) ou après déconvolution (p = 0,172), en outre, les courbes obtenues en microscopie par analyse d'images avant et après déconvolution ne sont pas significativement différentes (p = 0,469) (*Figure 16*).



Figure 16 : Evaluation comparative de la cinétique d'incorporation de la DNR à 2  $\mu$ M pour la lignée MCF-7 par analyse semi-quantitative : soit par analyse d'images avant et après déconvolution (densités moyennes rapportées à la valeur obtenue après 15 min d'incorporation), soit par cytométrie en flux (intensités de fluorescence médianes rapportées à la valeur obtenue après 15 min d'incorporation) (Gramain et al., 1997).

### 3.2. Analyses qualitatives

Les analyses qualitatives ont pour objectif d'évaluer si la déconvolution améliore le caractère résolutif des images 2D obtenues en fluorescence. Les critères de comparaison entre les images brutes et déconvoluées sont les suivants : le contraste de l'image et la résolution au niveau des contours cellulaires et intracellulaires.

Les images déconvoluées présentent un meilleur contraste, traduisant une amélioration du ratio signal/bruit. Au niveau cellulaire, la résolution est également de meilleure qualité permettant de mieux discriminer les membranes cellulaires, nucléaires ainsi que les organites intracellulaires (*Figure 17*).

© 2000 Wiley-Liss, Inc.

# Determination of Intracellular Organelles Implicated in Daunorubicin Cytoplasmic Sequestration in Multidrug-Resistant MCF-7 Cells Using Fluorescence Microscopy Image Analysis

#### Corinne Bour-Dill,<sup>1</sup> Marie-Pierre Gramain,<sup>2</sup> Jean-Louis Merlin,<sup>1</sup>\* Sophie Marchal,<sup>1</sup> and François Guillemin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Recherche en Oncologie, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-les-Nancy cedex, France <sup>2</sup>Laboratoire d'Intrumentation Médicale Automatisée en Cancérologie, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-les-Nancy cedex, France

Received 13 January 1999; Revision Received 18 August 1999; Accepted 23 September 1999

**Background:** Anthracycline resistance is known to be mediated by P-glycoprotein (P-gp) or multidrug-resistance related protein (MRP) as well as intracellular sequestration of drugs.

**Methods:** The resistance phenotype of doxorubicin-selected MCF-7<sup>DXR</sup> human breast adenocarcinoma cell line was characterized by cellular and nuclear daunorubicin efflux, P-gp and MRP expression and apoptosis induction. Daunorubicin sequestration was investigated through organelle markers (lysosomes, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus) and daunorubicin co-localization by dualcolor image analysis fluorescence microscopy using high numerical aperture objective lenses to achieve the smallest field depth and the best lateral resolution. Signal to noise and specificity ratios were optimized for daunorubicin and organelle fluorescent probes labeling.

**Results:** An original image analysis procedure was developed to investigate daunorubicin and organelles co-local-

Multidrug-resistant cancer cells are characterized by reduced intracellular drug accumulation and reduced cytotoxicity mediated by expression of cellular proteins and changes in cytosolic pH (1), as well as intracellular traffic (2). The decrease in intracellular concentration of drugs including effective chemotherapeutic agents such as vinca alkaloids, taxanes, and anthracyclines is related to the overexpression of P-glycoprotein (P-gp), which functions as an ATP-dependent efflux pump (3). In addition, alteration of anthracycline intracellular distribution was reported from fluorescence microscopy experiments (4-6) in resistant cell lines expressing P-gp, MDR-related protein (MRP) and the major vault protein (LRP) (7). Cellular resistance to anthracyclines have been widely investigated but the sequestration mechanisms remain unelucidated, and many organelles (lysosomes, mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus) have been hypothetically proposed to be implicated in many cell models in which ization. The reliability of the image analysis was controlled through chromatic shift and intensity linearity measurement using calibrated microbeads. The main contribution (65%) of Golgi vesicles in daunorubicin sequestration was demonstrated. Although no rational relationship could be established between daunorubicin sequestration and apoptosis induction, no apoptosis was observed in MCF-7<sup>DXR</sup> cells.

**Conclusions:** In addition to P-glycoprotein mediated drug efflux and without MRP overexpression, MCF-7<sup>DXR</sup> daunorubicin resistance phenotype involves drug sequestration within intracellular vesicles identified as Golgi vesicles and resistance to apoptosis induction. Cytometry 39:16–25, 2000. © 2000 Wiley-Liss, Inc.

**Key terms:** multidrug resistance; P-glycoprotein; daunorubicin; fluorescence microscopy; image analysis; apoptosis

cytoplasmic sequestration of anthracyclines results in decreased cytotoxicity (8). However, to our knowledge no rational identification using specific dyes have been reported.

Fluorescence microscopy is very often used to monitor subcellular distribution patterns of fluorescent drugs into living cells. Recently, high optical quality epifluorescence microscopes combined with high sensitivity and wide dynamic range cooled charge coupled devices (CCD) cam-

E-mail: jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

Grant sponsors: Ligue contre le Cancer; Pôle Européen de Santé: Région Lorraine; Communauté Urbaine du Grand Nancy; Groupe Inter-Régional de Recherche en Cancérologie; Olympus France; Alexis Vautrin Cancer Center private research funds.

<sup>\*</sup>Correspondence to: J.-L. Merlin, PharmD, PhD, Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-les-Nancy cedex, France.

eras have been associated to image analysis system. Such equipment allows performance of accurate fluorescence measurements in living cells. Moreover, recently, a number of techniques have become available for optical sectioning fluorescence microscopy, such as confocal imaging (9), multiple-photon excitation imaging (10), and computational deconvolution of fluorescence images (11). These techniques became very potent tools in cell biology because they allow the study of the three-dimensional distribution of fluorochromes within the specimens using non-invasive methods. In this paper, we focused on the mechanism of efflux and sequestration of daunorubicin in MCF-7<sup>DXR</sup>, a multidrug-resistant human breast adenocarcinoma cell line, and the MCF-7 parental sensitive cell line. The involvement of P-gp, MRP and/or LRP overexpression in the cellular resistance to daunorubicin has been evaluated. Furthermore, daunorubicin sequestration was studied by means of two-dimensional (2D) epifluorescence microscopy. A rational methodology, aiming at measuring the degree of co-localization of fluorescence signals emitted by daunorubicin and organelle markers, was developed using dual-color image analysis after optimization of experimental conditions including biological (cell number, drug, and fluorochrome concentration, incubation duration), and instrumental (light intensity, acquisition time) parameters.

#### MATERIALS AND METHODS Cell Lines and Culture

Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France), and culture media and additives from GIBCO (Cergy-Pontoise, France). Daunorubicin (DNR) was obtained from Rhone Poulenc Rorer Bellon (Neuilly, France). MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line and its subline MCF-7<sup>DXR</sup>, which was found to be approximately 200-fold resistant to daunorubicin (12), was cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. The resistant subline, MCF-7<sup>DXR</sup>, were maintained in 10  $\mu$ mol/l doxorubicin-containing medium. A wash-out period of 7 days in doxorubicin-free medium was allowed before starting the experiments.

#### P-gp, MRP, and LRP Protein Expression

P-gp, MRP, and LRP expression in the resistant cells were investigated by immunolabeling according to Merlin et al. (6) using flow cytometry performed on Orthocyte flow cytometer equipped with a xenon lamp (Ortho Diagnostic Systems, Roissy, France). 4E3 (Dako, Trappes, France), QCRL1 (Centocor, Malvern, PA) and LRP56 (Tebu, Le Plessy en Yvelines, France) monoclonal antibodies were used and coupled to fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse IgG serum (Sigma, St Quentin, France) for 30 min at 4°C. Nonrelevant rabbit IgG was used as negative control for background fluorescence. Dead cells or membrane altered cells were identified by addition of 75  $\mu$ mol/L propidium iodide. Excitation wavelength was 488 nm. Fluorescence emission was analyzed through 530 nm bandpass and 575 nm long pass filters.

#### Tritiated Daunorubicin Intracellular Distribution

The total cellular and nuclear accumulation of  $[{}^{3}H]$ daunorubicin ( $[{}^{3}H]$ -DNR) was determined according to a procedure adapted from Merlin et al.. (13). Cells suspensions were incubated with 2 µmol/L tritiated daunorubicin solution for 2 h at 37°C. Cell lysis was performed by incubating the cells in cold 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.6). Then, after centrifugation, cytosol and nuclei were collected and finally diluted in scintillation cocktail (Ready Safe, Beckman) and counted for radioactivity (LS1800 counter, Beckman).

#### Fluorescence Microscopy Specimen Preparation

MCF-7 and MCF-7<sup>DXR</sup> cells were cultured in Slideflask (Nunc, PolyLabo, France) maintaining living adhesive cells during observation. In addition, this procedure considerably reduced the thickness of the specimen and, therefore, the out-of-focus phenomenon during epifluorescence microscopy. DNR fluorescence distribution was evaluated in MCF-7 and MCF-7<sup>DXR</sup> incubated in 30  $\mu$ mol/L DNR solution for 2 h.

#### Fluorescent Probes for Intracellular Organelles Labeling

Lysosome and nuclear DNA were detected using acridine orange (AO, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) at 3.5  $\mu$ mol/L for 15 min as described by Swanson et al.. (14). When combined with lysotracker blue (LB, Molecular Probes) at 10  $\mu$ mol/L during 60 min, AO concentration was reduced to 0.035  $\mu$ mol/L as adapted from Diwu et al.. (15). Golgi apparatus was labeled using 0.3  $\mu$ mol/L NBD-C<sub>6</sub>-ceramide (NBD, Molecular Probes) for 10 min, endoplasmic reticulum was labeled using 2.5  $\mu$ mol/L DiOC<sub>6</sub> (Molecular Probes) for 1 min (14).

Dual-staining procedure, for DNR and organelle labeling, consisted in first incubating the cells with DNR, washing twice with phosphate-buffered saline (PBS), then in labeling with the organelle probe. Monolayered cells were finally washed in PBS. Fluorescent probes and DNR concentrations as well as the incubation times were adjusted to achieve optimal dual-staining visualization (data not shown).

#### Fluorescence Microscopy

**Microscope.** An AX 70 Provis upright epifluorescence microscope (Olympus, Rungis, France) was fitted with UPFL plan apochromatic, high numerical aperture (NA) objective lenses (Olympus, France). Oil immersion  $100 \times /$ 1.35 NA (immersion oil refractive index = 1.516) and water  $60 \times$  PSF/1.20 NA were used. Light source was a 100 W mercury vapor lamp. The filter set to detect daunorubicin and AO (acidic compartment) consisted of a 400-440 or 460 - 490 nm bandpass (BP) excitation filter, a 570 nm dichroic mirror (DM) and a 590 nm long-pass (LP) barrier filter. AO (DNA labeling), NBD and DiOC<sub>6</sub> were detected using a filter set composed of a 460 - 490 nm BP excitation filter, a 505 nm DM and a 510 - 550 nm BP filter. LB was detected using a filter set composed of a 330 - 385 nm BP excitation filter, a 410 nm DM and a 420 - 460 nm BP filter. Neutral density filters reducing excitation light transmission to 1.5, 6 and 25% were used to reduce photobleaching occurring during image acquisition. The drug and fluorochromes photobleaching during light irradiation (mercury vapor lamp) were investigated with and without neutral density filter (NdF). Fluorescence intensity measurements were carried out using a E717-23 photomultiplier (Hamamatsu, Japan) inserted onto the microscope output. Measurement of fluorescence intensity variation during light exposure allowed to evaluate photobleaching reduction by NdF. Without NdF the decrease in fluorescence intensity induced by light exposure during image acquisition ranged between 18 and 49%. Using NdF allowed to reduce photobleaching to less than 15% (range 4–10% and 4–14% for 6 and 1.5% NdF, respectively.).

**Two-dimensional (2D) fluorescence microscopy.** Two-dimensional images were recorded using a LH 1600 Peltier cooled 12 bit CCD camera (Lhesa Electronique, Cergy-Pontoise, France). The physical pixel size was  $9 \times 9 \ \mu m^2$  and the matrix size was  $1536 \times 1024$  pixels. Images were 8 or 12 bit encoded for bright-field and fluorescence images, respectively. All were processed using AnalySIS Pro image analysis software (SIS, Münster, Germany).

Chromatic aberrations were analyzed using  $3.2 \mu$ m-test polystyrene beads (Fluorosphere, Dako) bearing a mixture of fluorochromes emitting at wavelengths consistent with those of the fluorochromes used for biological experiments, i.e., in blue, green, and red spectral range. Beads size choice was made as a compromise to fit with the size range of intracellular organelles (lysosomes, Golgi vesicles, nuclei).

Moreover, the linearity of the gray-level detection scale was controlled using 2.5  $\mu$ m beads calibrated in fluorescence relative intensity (Inspeck Green, Molecular Probes) emitting at 515 nm under 490 nm excitation. The results of fluorescence microscopy images analysis were then compared with the results of flow cytometry analysis and found to correlate (r = 0.990) (data not shown).

Three-dimensional (3D) fluorescence microscopy. An AX 70 Provis epifluorescence microscope was equipped with the Scanalytics EPR<sup>TM</sup> System (IPLab-Scanalytics, Fairfax, VA) using a 60× PSF / 1.2 NA water immersion objective. The scanning along the optical axis was performed using a piezoelectric z-axis focus device. Three-dimensional images were obtained by stacking two-dimensional images from consecutive focal planes. Images were collected as a set of 75 consecutive optical sections assessed with 0.4  $\mu$ m zspacing (10 nm precision). Images were recorded using a cooled 12 bit CCD Sensys camera (Photometrics, Tucson, AZ). The physical pixel size was 6.8 × 6.8  $\mu$ m<sup>2</sup> and the matrix size was 1317 × 1035 pixels.

#### DNR and Organelle Co-localization

**Visualization.** Image recording was performed with fixed exposure time during single labeling experiments. Dual staining images were finally encoded in pseudocolors from 12 bit images collected separately with each fluorochrome (DNR/organelle probe), converted to 8-bit images and then combined with each pixel encoded on a 24-bit RGB color scale. **Image analysis.** The reliability of the methodology was assessed according to Usson et al. (16) by measuring the variability of the segmentation results on the same set of 15 cells analyzed by the same user in three independent experiments (intra-individual variability) and by five different users (inter-individual variability). One of them was considered an "expert," and four did not use the image analysis system routinely.

Four difficulty levels for image analysis were classified from 1 to 4 with increasing image segmentation complexity: level 1 being defined as high contrast isolated cell population image, level 2 as high contrast mixed isolated and confluent cell population, level 3 as high contrast confluent cell population, level 4 as low contrast confluent cell population.

Morphological criteria to evaluate the reproducibility were the area (sum of pixels on designed area) and the form factor (Euclidean ratio) of the region of interest (calculated factor tending to 1 when the form tends to be circular).

Mean density was calculated as the sum of pixels values measured within an area and divided by the number of pixels (17,18). Fluorescence signal-to-noise ratio (SNR) and signal specificity ratio (S) were calculated during optimization as adapted from Sabri et al. (19) and Dellian et al. (20).

SNR was defined as:

$$\text{SNR} = \frac{F}{N} = \frac{\sum_{(i)=m}^{n} H_i \times (i) \left| \sum_{(i)=m}^{n} H_i \right|}{\sum_{(i)=0}^{p} H_i \times (i) \left| \sum_{(i)=0}^{p} H_i \right|}$$

where *F* is the fluorescence and *N* the background noise which are detected; *i* is the value of gray level associated to the pixels of the region of interest (ROI) between *m* and *n* and *o* and *p*, respectively, for signal and background; *H* is the number of pixels associated to *i*.

S was defined as:

$$S = \frac{F_s - N_s}{F_{ns} - N_{ns}}$$
$$= \frac{\sum_{\substack{(i)=m \\ (j)=m}}^n H_i \times (i) \left/ \sum_{\substack{(i)=m \\ (j)=m}}^n H_i - \sum_{\substack{(i)=q \\ (j)=m}}^r H_i \times (j) \right/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^p H_j \times (j) \left/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j - \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^t H_j \times (j) \right/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \right/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \left/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \right/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \right/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \left/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \right/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \right/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \right/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \left/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m}}^r H_j \times (j) \right/ \sum_{\substack{(j)=m \\ (j)=m \\ (j)=m$$

where *S* is the specificity factor, illustrating the cross-talk in each signal;  $F_s$  and  $N_s$  are, respectively, fluorescence and background noise in specific signal;  $F_{ns}$  and  $N_{ns}$  are, respectively, fluorescence and background noise in nonspecific signal; *i* and *j* are values of gray level associated to the pixels of the ROI, respectively, for specific and nonspecific signals between, *m* and *n*, and, *o* and *p*, for  $F_s$  and  $F_{ns}$  and, q and r, and, s and t, for  $N_s$  and  $N_{ns}$ , respectively; H is the pixel number associated with i or j. The ROI coordinates of  $F_s$  and  $F_{ns}$  are identical.

Bright-field images were corrected for heterogeneities of illumination using sample-independent background shading function (21). Areas containing only one cell were outlined to obtain binary masks as described by Usson et al. (16).

In fluorescence images, background noise reduction was assessed in subtracting (absolute subtraction) the mean value of fluorescence measured in an area without cells (21,22). Negative values were set to zero and thus, had no influence on the following image processing steps. Fluorescence image binarization consisted in threshold definition. The procedure began by an equalization, threshold determination and ended with a top-hat morphological treatment.

Binary images from fluorescence images resulting from each probe were compared with binary mask from the bright-field images using the "and logic" arithmetic tool in order to restrict the measurement to the cells fully contained. The "and logic" operation was applied to the resulting images to obtain the co-localized pixel frequency in both components as adapted from Manders et al. (23).

This methodology was controlled using two kinds of models. First, Fluorosphere beads (Dako) were used as synthetic model simulating a unique particle emitting in different spectral ranges. Second, fluorescent probes labeling biological organelles were used. As positive control. lysosomes were double-labeled using AO and LB with emission peaks respectively in the red (610 nm in acidic compartment) and in the blue (422 nm) spectral range in order to mimic theoretical "100% co-localization." As "negative control," cells were labeled for lysosomes and DNA using AO emitting in the green spectral range (527 nm) when bound to DNA and in the red spectral range (610 nm) when located in an acidic lysosomal compartment in order to mimic theoretical "0% co-localization." Each analysis was performed on at least 30 cells from three independent experiments.

#### Morphological Determination of Apoptosis

Twenty-four to 72 h after completion of 2  $\mu$ mol/L daunorubicin exposure for 2 h in Slideflasks, cells were rinsed twice in PBS, then stained with a Hoechst 33342 (Molecular Probes, Interchim, Asnières, France), 5  $\mu$ g/ml solution in PBS according to Belloc et al. (24). Fluorescence microscopy analysis was then performed with excitation at 330–385 nm and emission at 420–460 nm using the AX70 Provis epifluorescence microscope. Cells were classified as "intact cells" with uncondensed chromatin and "apoptotic cells" exhibiting apoptotic features, i.e., perinuclear condensed chromatin and apoptotic bodies. All analyses were performed by morphological examination of at least 150 cells and repeated at least twice. Results are presented as percentage of apoptotic cells.

#### Statistical Analysis

Results were analyzed for statistical significant differences using nonparametric Wilcoxon, Mann-Whitney

Table 1

Total Cellular Accumulation and Nuclear Distribution of Tritiated Daunorubicin in Sensitive (MCF-7) and Resistant ( $MCF-7^{DXR}$ ) Cells\*

	MCF-7	MCF-7 <sup>DXR</sup>	Significance
Accumulation <sup>a</sup>	90.2 (8.1)	26.2 (3.8)	P < 0.05
Nuclear ratio	0.76 (0.12)	0.51(0.12)	P < 0.05

\*All results are mean values of three independent experiment (standard deviation). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test.

<sup>a</sup>Results are expressed as mean of intracellular accumulation of tritiated daunorubicin  $(pmol/10^6 \text{ cells})$ .

<sup>b</sup>Results are expressed as mean nuclear/total cell accumulation in either sensitive and resistant cells.

tests and variance analysis using ANOVA with Scheffe procedure. In all cases, the limit for significance was set to P < 0.05.

#### RESULTS P-gp, MRP, LRP Protein Expression

Both MCF7 and MCF-7<sup>DXR</sup> cell lines were found negative for LRP expression (<5% labeled cells) and slightly positive for MRP expression (11  $\pm$  5% labeled cells). P-gp was strongly expressed in MCF-7<sup>DXR</sup> (92  $\pm$  7% labeled cells) and not detectable in the parental cell line.

#### Daunorubicin Intracellular Distribution

In MCF-7<sup>DXR</sup> cell line, using tritiated daunorubicin (DNR), the resistance phenotype was found to be mediated not only by a dramatic decrease in DNR total cellular accumulation (Table 1) but also by a significant decrease (P < 0.05, nonparametric Mann-Whitney test), in the nucleus/total ratio. This demonstrated that, in addition to P-gp-mediated DNR efflux, the resistance phenotype mechanism induced nuclear distribution alteration.

Using fluorescence microscopy, in MCF-7 cells, DNR was found to be diffusely distributed inside the nucleus and cytoplasm. This distribution was different in the MCF-7<sup>DXR</sup> cell line, with a low total fluorescence intensity, in agreement with tritiated DNR data (Table 1). In addition, DNR was frequently detected inside perinuclear vesicles. These data were confirmed using 3D fluorescence imaging. In addition, 3D analyses demonstrated that the cytoplasmic distribution of DNR was mainly restricted to perinuclear vesicles and few vesicles in the vicinity the of cytoplasmic membrane (Fig. 1). The in-focus localization of the perinuclear vesicles, at the image plane, was consistent with the z-resolution of the objective used for 2D analysis. Moreover, no other compartment inside the totality of the z-volume of cells was detected to sequestrate DNR, thus validating the 2D co-localization studies.

#### **DNR and Organelle Dual Staining**

The diffuse DNR fluorescence pattern observed in MCF7 cells illustrated the lack of specific targeting of the drug in the Golgi apparatus or endoplasmic reticulum (Fig. 2, 1B and 1D). No or few co-localizations of DNR and  $DiOC_6$ , probing endoplasmic reticulum, were detected in


B 35 μm

Fig. 1. Panel of images obtained by optical sectioning on z axis (0.4 $\mu$ m) using a 60 $\times$  PSF/1.2 NA objective for DNR distribution with MCF-7 (A) and MCF-7<sup>DXR</sup> (B) cells. The filter sets used were excitation BP 460-490 nm, emission LP 590 nm.

MCF-7<sup>DXR</sup> cells, whereas DNR appeared to be often colocalized with NBD-C<sub>6</sub>-ceramide probing Golgi apparatus (Fig. 2, 1A). Based on these results, achieved in both sensitive and resistant cell lines, a 2D-image analysis study was envisaged in MCF-7<sup>DXR</sup> cells to quantitate the colocalization rate of DNR and NBD-C<sub>6</sub>-ceramide probing Golgi vesicles.

# 2D Image Analysis

**Reproducibility of 2D-image analysis process.** In order to evaluate the reliability of the segmentation procedure on bright field images, experiments were performed to determine if results could be impaired by novice users' interpretation. A panel of 15 cell images was selected representing the experimental conditions frequently encoun-

tered, including disposition (isolated cells versus juxtaposed cells), form, and contrast variations then submitted to analysis by five users (one expert and four novices). Variation coefficients were calculated for area and form factor criteria (Table 2) according to four segmentation difficulty levels noted 1 to 4 with increasing difficulty.

No significant differences (Wilcoxon nonparametric test) concerning the intra-individual experiments (n = 3) were obtained with both criteria. Results evidenced no significant statistical differences between the five users for both criteria concerning the easiest levels (1 and 2). However, for the most difficult levels (3 and 4), significant differences (form criteria: P = 0.007; area criteria: P = 0.043) were only observed for one novice user as compared with the four others.



Fig. 2. (1) Double-stained combinations obtained with a  $100 \times / 1.35$  NA objective: Golgi apparatus probe (NBD) and DNR (A–B), endoplasmic reticulum probe (DiO<sub>6</sub>) and DNR (C–D), in MCF-7 (B–D), and MCF-7<sup>DXR</sup> (A–C) cells. Conditions of detection are described in the Materials and Methods section. Results are presented as pseudo-color images by superimposition of "red color" image concerning DNR, and "green color" image concerning the organelle fluorochrome (NBD or DiOC<sub>6</sub>). (2) Co-localization analysis in MCF-7<sup>DXR</sup> with  $60 \times$  PSF/1.2 NA objective: staining of nucleus and lysosomes by acridine orange and lysotracker blue (B); and DNR with staining of Golgi apparatus by DBD (C). Conditions of detection are described in the Materials and Methods section. All dual stained combination images are the results of independent dual-stained samples.

**Optimization of double-labeling process.** A beads model allowed the control of the multi-wavelength detection conditions as well as the image analysis process. Results demonstrated that among the three filter sets, the best spectral configuration of dual-detection was achieved using (BP330-385/BP420-460), (BP460-490/LP590), and (BP460-490/BP 510-550) filter sets. However, resolution

10 µm

and analysis procedures allowed detection of residual chromatics aberrations (Table 4).

Table 3 illustrates the best compromises obtained to optimize the SNR and specificity in double-labeled biological specimens. The 1.5% neutral density filter (NdF) was used to reduce photobleaching. Biological controls of the double-labeling procedure (lysosomes versus nucleus as

21

BOUR-DILL ET AL.

Difficulty	Intra-individual $(n = 3)$				Inter-individual $(n = 5)$			
levels	1	2	3	4	1	2	3	4
Area Form factor	2 1	2 2	2 2	2 5	3 3	6 6	9 9	13 7

\*Results are expressed as coefficient of variation (%). Difficulty levels for image analysis were classified from 1 to 4 with increasing image segmentation complexity (for details, see Materials and Methods).

 Table 3

 Signal to Noise Ratio [SNR] and Specificity [S] Optimal Values

 Achieved in Resistant MCF-7<sup>DXR</sup> Cells (for Calculation, see

 Materials and Methods)\*

MCF-7 <sup>DXR</sup>	DNR <sup>a</sup>	NBD <sup>b</sup>	LB <sup>c</sup>	OAd
[SNR]	2.4 (0.1)	2.8 (0.0)	1.9 (0.0)	1.9 (0.6)
[S]	5 (0.9)	4 (0.5)	17.8 (8.7)	4.1 (0.1)

\*Cells were analyzed for daunorubicin cellular sequestration<sup>a</sup> and stained for organelle identification using NBD-C6 ceramide for Golgi<sup>b</sup>, lysotracker blue for lysosomes<sup>c</sup> and acridine-orange<sup>d</sup> for lysosomes and nucleus (for incubation procedures, see Materials and Methods). All results are mean values of three independent experiment (standard deviation).

negative and lysosomes versus lysosomes as positive) pointed out the limit of this technique (Fig. 2, 2). Although these two configurations were significantly different (ANOVA, P < 0.001), absolute co-localization (100%) or complete lack of co-localization (0%) were never achieved (Table 4) probably in relation with the residual chromatic aberrations and fluorescence image analysis procedure artifacts evidenced with beads model.

DNR and Golgi apparatus co-localization. Daunorubicin concentration varied from 5 to 50 µmol/L, NBD- $C_{6}$ -ceramide (NBD) concentration from 0.1 to 3  $\mu$ mol/L and the incubation durations ranged from 30 min to 3 h and from 5 to 30 min, respectively. The excitation, emission and attenuation filters were optimized to achieve the highest SNR with the higher specificity. The best results (Table 3) were achieved with 30 µmol/L DNR for 2 h and 0.3 µmol/L NBD for 10 min. Bandpass excitation filter 400-440 and 460-490 nm, respectively, for DNR and NBD were found to be optimal to minimize the photobleaching of NBD (Fig. 2, 2). Conventional emission filters, i.e., 590 nm long pass and 510-550 nm bandpass filters, for DNR and NBD, respectively, were found to be suitable. Attenuation filters absorbing 94% and 75% of the signals were used for DNR and NBD, respectively. In such experimental conditions, concomitant DNR and NBD labeling were significantly different (ANOVA) from the biological controls mimicking "positive" and "negative" co-localizations (Table 4). Therefore, 65% of DNR-sequestrating vesicles were found to be co-localized with NBD-C6-ceramide, while the remaining 35%, unlabeled by NBD-C<sub>6</sub>-ceramide, were found to be spatially located near the Golgi apparatus or in the vicinity of the plasma membrane (Table 4).

#### **Apoptosis Induction**

In the present experimental conditions, apoptosis did not appear to be a major phenomenon in sensitive MCF7 cells (Fig. 3), with less than 10% apoptotic cells, 24 h after exposure to DNR (Table 5). In MCF-7<sup>DXR</sup> cells, no significant apoptosis induction was observed. These data, confirmed as apoptosis induction, were followed up to 72 h with a slight increase in apoptotic cell population in MCF7 cells while no variation was observed in MCF-7<sup>DXR</sup> cells.

#### DISCUSSION

It has been previously described that P-glycoprotein was located in the plasma membrane of MDR cells lines (25) and tumor cells (26) and inside healthy tissues, which have excretory and detoxifying functions in common (3). The detection of P-gp on the cell surface is related to anthracyclines efflux, and therefore to drug resistance (27). In order to reverse this resistance, several generations of P-gp inhibitors, such as quinine (28), verapamil, cyclosporine A, S9788 (13), and SDZ-PSC-833 (29) have been evaluated. However, many studies demonstrated only partial overcoming of drug resistance using chemomodulators such as cyclosporine A or verapamil (13,30). Over the past few years, several studies focused on the subcellular alteration of DNR distribution in P-gp- and non-P-gp-expressing hematopoietic (4) or carcinoma (25) cell lines. In our previous paper (6), differences in DNR intracellular distribution were found in MCF-7 and in P-gpexpressing multidrug-resistant MCF-7<sup>DXR</sup> cell lines. MCF-7 cells presented a nuclear and cytoplasmic diffuse localization contrasting with a decrease of DNR inside the nucleus and a shift to a "punctate" pattern of distribution in MCF-7<sup>DXR</sup>

In the present study, experiments were aimed to understand the mechanisms of DNR cytoplasmic sequestration in an MCF- $7^{DXR}$  cell line compared to its parental cell line, MCF-7. An original approach was developed based on several complementary techniques in order to check the resistance mechanism and the implication of DNR distribution between different intracellular compartments. In MCF- $7^{DXR}$  cells, P-gp-mediated drug efflux was found to be associated with intracellular drug sequestration as evidenced from tritiated DNR distribution studies as well as fluorescence microscopy.

Natural DNR fluorescence allowed to study its intracellular distribution using 2D epifluorescence microscopy image analysis. Among fluorescence microscopy, two major technologies, epifluorescence and confocal, are available. Confocal microscopy is particularly adapted to fixed samples and single fluorescence detection (31). Conversely, with living samples, confocal microscopy is usually more damaging (irradiation time during scanning), and multi-wavelength labeling is more expensive (several lasers) or restricting (working with single excitation wavelength). Furthermore, recent studies demonstrated that using confocal microscopy did not solve completely the problem of photobleaching (32) and chromatic (33) or spherical aberrations (34).

#### DAUNORUBICIN SEQUESTRATION IN MDR CELLS

Model excitation and	Fluorosp	here beads	MCF-7 <sup>DXR</sup> cells					
emission filters	Theoretical	Experimental	Theoretical	Experimental	Co-localization			
BG and BP <sup>a</sup>	100	86 (3) <sup>b</sup>	0	4 (2)	Nucleus and lysosomes "negative control"			
BR and UB	100	94 (2)	100	94 (2)	Double-labeled lysosomes "positive control"			
VR and BG	100	93 (1)	?	65 (3)	Sequestrating vesicles (DNI and Golgi (NBD)			

Table 4						
Co-localization Analysis	Using Flu	orosphere	Beads a	and	Double-Labeled MCF-7 <sup>DXR</sup>	Cells

<sup>a</sup>Filter sets used were BG (excitation BP 460 - 490 nm, emission BP 510 - 550 nm); BR (excitation BP 460 - 490 nm, emission LP 590 nm); UB (excitation BP 330 - 385 nm, emission BP 420 - 460 nm) and VR (excitation BP 400 - 440 nm, emission LP 590 nm).

<sup>b</sup>Results were expressed as mean percentage of common pixels in binarized images resulting from dual emission detection and are mean values of 3 independent experiment (standard deviation).





FIG. 3. Morphological DNA features stained with Hoechst 33342 and with  $60 \times PSF/1.20$  NA objective in MCF-7 (A) and MCF-7<sup>DXR</sup> (B) treated with 2  $\mu$ mol/L DNR for 2 h and observed 72 h after drug exposure. The filter set used was excitation BP 330-385 nm, emission BP 400-420 nm

Table 5
Apoptotic Cells Fraction During Time Kinetics of
Induction by 2 b Daunorubicin Treatment Analyzed
by Morphological Criteria*

Cell lines	Time (h) after 2 h exposure to 2 $\mu$ M daunorubicin <sup>a</sup>					
	24	48	72			
MCF-7 MCF-7 <sup>DXR</sup>	6.5 (0.5) 1 (0.5)	12.5 (1.5) 2 (1)	12.5 (0.5) 2 (1.5)			

\*All results are mean values of experiments repeated twice (standard deviation).

<sup>a</sup>Results are expressed as a percentage of apoptotic cell fraction detected by staining with Hoechst 33342 exhibiting apoptotic features.

Using epifluorescence microscopy for 2D images analysis is limited because this instrumentation has some disadvantages, such as photobleaching during irradiation and out of focus plane image artifacts (31). In the present study, conjugation of control procedures associated to instrumental and biological optimization allowed the reduction of the incidence of these artifacts. High numerical aperture objective lenses were selected to achieve better axial and lateral resolution. In such conditions, epifluorescence observations of adhesive cells further reduced out of focus information. Moreover, relative quantitative measurements were feasible in MCF-7<sup>DXR</sup> cells in which DNR accumulation was low and punctated. These experimental conditions were selected to optimize the optical pathway during image formation. Concerning image analysis, the linearity of intensity detection on beads and biological samples were controlled as already described in previous work (35). Chromatic aberrations were controlled on beads and biological samples using the same criteria (degree of co-localization) rather than shifted distance measurements as proposed by Manders et al. (33). To obtain the better dual staining and image acquisition, signal-to-noise and specificity ratios were analyzed. Both parameters allowed determination optimal drug or fluorochrome concentration, incubation duration, neutral density filter and time exposure for image acquisition. Regarding segmentation of bright field images and to improve robustness, different steps were studied and compared between different users. The image analysis process was found to be reproducible, and not user-dependent. Con100

cerning thresholding on gray level, our results are in agreement with Mapilca et al. (21) who did not chose a procedure that included a constant threshold because several parameters could not be controlled between inter-experimentations (previous and unequal light exposure in the time, cellular background).

Using qualitative analysis of dual-label fluorescence images, in sensitive MCF7 cells, DNR was mainly distributed in the nucleus but was also found to accumulate inside cytoplasm organelles, such as endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Conversely, in MCF-7<sup>DXR</sup>, in addition to P-gp-mediated efflux, DNR was found to be sequestrated inside cytoplasmic vesicles which were identified inside the 2D-focused-plane as belonging to the Golgi compartment in most cases (65%). Based upon spatial distribution considerations, the remaining vesicles (35%) probably belong to an acidic compartment such as lysosomes, secretory vesicles, or endosomes.

These results add data to the controversial debate aimed at defining organelles implied by anthracyclines sequestration in MDR cell lines. Many hypotheses have been proposed in various cell models, such as lysosomes and mitochondria (4) in P-gp-positive and -negative drug-resistant cell lines, Golgi apparatus and mitochondria (2) or endoplasmic reticulum (36) in the MRP cell line, lysosomes and trans-Golgi compartment (37, 38) or Golgi (39) in MCF- $7^{DXR}$  cells.

The present results show that mitochondria are most likely not implicated in the sequestration of DNR. Mitochondria have been suggested as sequestration target from a conventional fluorescence microscopy experiment in MRP HL60<sup>DXR</sup> (2) as well as using confocal microscopy in several MDR and MRP cell lines (4). However, in these studies, the experimental procedures differed from ours, since the cells were qualitatively analyzed without being attached to glass slides and only with single DNR or organelles probes fluorescence analysis.

The endoplasmic reticulum was assigned by Marquard et al. (36) as sequestrating DNR vesicles in MRP HL60<sup>DXR</sup>, which was supported by various treatments with agents regulating the organelle pH. In the present study, no MRP overexpression was measured, and therefore it cannot be implicated in the sequestration mechanism. This was consistent with fluorescence microscopy image results pointing out no co-localization between DiOC<sub>6</sub>, probing the endoplasmic reticulum, and DNR.

Although alkaline shift of the cytosolic pH have been measured in acquired and transfected MDR cells, using ratiometric fluorescent probes for pH by confocal fluorescence imaging (1), no direct evidence was given concerning the major involvement of lysosomes in conjunction with drug trapping by pH disregulation mechanism. The hypothesis that vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase (V-H-ATPase) regulating the pH of acidic vesicles could be a mean by which cytosolic pH could be raised was proposed. Since this study, Bendera et al. (38), using confocal microspectrofluorometric analysis, investigated the involvement of V-H-ATPase in anthracycline cytoplasmic trapping. Using brefeldin (V-H-ATPase inhibitor), V-H-ATPase was found not to be implicated in DNR partitioning in P-gp overexpressing MCF-7<sup>DXR</sup> cell line as opposed to MRP overexpressing MCF-7<sup>ETP</sup> cell line.

Molinari et al. (39) reported that in MCF-7<sup>DXR</sup>, using qualitative images analysis of confocal dual-immunolabeling on fixed cells, P-gp was located inside Golgi vesicles. Furthermore, P-gp was detected inside cytoplasmic and nucleus in several of MDR cells lines using immunoblot analysis (27), immunoelectron microscopy (40), or immunofluorescence microscopy (18,40). To understand the physiologic explanation to detect this surface protein in cytoplasmic organelles, Labroille et al. (18) studied the cytoplasmic trafficking of P-gp and reported that P-gp, after maturation from endoplasmic reticulum, was stored inside the Golgi compartment and then trafficked toward the plasma membrane thanks to secretory compartments.

Our results demonstrating that Golgi vesicles containing P-gp could explain mainly intracellular DNR sequestration are in agreement with these data and suggest that functional cytoplasmic P-gp should exist in MCF-7<sup>DXR</sup> in addition to surface P-gp (6).

From the present study, no clear relationship between DNR sequestration in Golgi vesicles and apoptosis induction can be established. However, no apoptosis induction was detected in DNR-sequestrating resistant cells as opposed to sensitive cells. Additional experiments should be performed to investigate whether DNR sequestration could lead to inhibition of apoptosis induction. In such an experimental set-up, compounds able to modulate DNR intracellular sequestration would be helpful. This might be achievable using P-gp blockers at low concentrations as suggested by our previous results (41).

In the present study, 2D-epifluorescence microscopy image analysis was shown to be useful to easily and rapidly yield relative quantitative data in living samples. The application of multi-wavelength fluorescence image analysis can be used when the information is spatially limited, or when fluorochromes probe different compartments. Deconvolution could be optimized using 2D (35) or 3D optical sectioning epifluorescence microscopy (42) or by using the same algorithms which produce superresolution 3D images of fluorescent probe distribution inside cells with minimal light exposure (11). Deconvolution improves the analysis process that can restore volume or intensity information (considering each planes of objects), or facilitates segmentation on gray levels (higher contrast, better SNR).

The clinical relevance of the present study should be investigated. If confirmed, failure of chemomodulation to obtain complete reversion could be explained, and anthracycline derivatives acting more efficiently in the cytoplasm could be associated with resistance modulators directed against surface or cytoplasmic P-gp or combined with anticancer drugs acting mainly onto cytoplasmic targets.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Dr. M. Barberi-Heyob for her contribution in statistical analysis and to Dr. D. Dumas and Pr JF. Stoltz (Laboratoire d'AngioHématologie-Hémorhéologie, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy, France) for their helpful contribution to the 3D fluorescence microscopy.

#### LITERATURE CITED

- 1. Simon S, Roy D, Schindler M. Intracellular pH and the control of
- multidrug resistance. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:1128-1132 Hindenburg A, Baker MA, Gleyzer E, Stewart V, Case N, Taub RN. Effect of verapamil and other agents on the distribution of anthracyclines and on other agents on reversal of drug resistance. Cancer Res 1987;47:1421-1425.
- 3. Endicot JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. Annu Rev Biochem 1989;58:135-171
- Gervasoni JEJ, Fields SZ, Krishna S, Baker MA, Rosado M, Thuraisamy 4. K, Hindenburg AA, Taub RN. Subcellular distribution of daunorubicin in P-glycoprotein-positive and -negative drug-resistant cell lines using
- laser-assisted confocal microscopy. Cancer Res 1991;51:4955-4963. Sognier MA, Zhang Y, Eberie RL, Sweet KM, Altenberg GA, Belli JA. Sequestration of doxorubicin in vesicles in a multidrug-resistant cell line (LZ-100). Biochem Pharmacol 1994;48:391-401.
- 6. Merlin JL, Marchal S, Ramacci C, Dieterien A, Schultz G, Lucas C, Poullain MG, Berlion M. Influence of S9788, a new modulator of multidrug resistance, on the cellular accumulation and subcellular distribution of daunorubicin in P-glycoprotein-expressing MCF7 human breast adenocarcinoma cells. Cytometry 1995;20:315-323. 7. Scheper RJ, Broxterman JH, Scheffer GI, P. K, Dalton WS, Van Hei-
- jningen THM, Van Kalken CK, Slovak ML, De Vries EGE, Van der Valk P, Meijer CJLM, Pinedo HM. Overexpression of a M, 110.000 vesicular protein in non P-glycoprotein-mediated multidrug-resistance. Cancer Res 1993;53:1475-1478.
- Abbaszadegan MR, Cress AE, Futscher BW, Bellamy WT, Dalton WS. Evidence for cytoplasmic P-glycoprotein location associated with increased multidrug resistance and resistance to chemosensitizers. Cancer Res 1996;56:5435-5442.
- Cole NB, Smith CL, Sciaky N, Terasaki M, Edidin M, Lippincott-Schwartz J. Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of
- bernstat in Statistical in Statistics of Stoge proteins in inclustrates of living cells. Science 1996;273:797–801.
   Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluo-rescence microscopy. Science 1990;248:73–76.
   Carrington WA, Lynch RM, Moore EDW, Isenberg G, Fogarty KE, Fay
- FS. Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal exposure. Science 1995;268:1483-1487.
- 12. Abderrabi M, Marchal S, Merlin JL. Comparative in vitro evaluation of dithiane analogs of tiapamil, Ro 11-2933, Ro 44-5911 and Ro 44-5912 as multidrug resistance modulators. Anti-cancer Drugs 1996;7:430-436.
- 13. Merlin JL, Guerci A, Marchal S, Missoum N, Ramacci C, Humbert JC, Tsuruo T, Guerci O. Comparative evaluation of \$9788, verapamil, and cyclosporine A in K562 human leukemia cell lines and in P-glycoprotein-expressing samples from patients with hematologic malignancies. Blood 1994;84:262-269.
- 14. Wang YL, Lansing-Taylor D. Methods in cell biology, Vol. 29, Part A.
- San Diego: Academic Press; 1991. 333 p.
  Diwu Z, Zhang YZ, Haughland RP. Novel site-selective probes for lysosomes and acidic staining and long-term tracking. Cytometry 1994;Suppl 7:77.
- 16. Usson Y, Guignandon A, Laroche N, Lafage-Proust MH, Vico L. Quantitation of cell-matrix adhesion using confocal image analysis of focal contact associated proteins and interference reflection microscopy. Cytometry 1997;28:298-304.
- Inoué S. Digital image processing and analysis video microscopy. New York: Plenum Press; 1986. 500 p.
   Labroille G, Belloc F, Bilhou-Nabera C, Bonnefile S, Bascans E, Bois-
- seau MR, Bernard P, Lacombe F. Cytometric study of intracellular P-gp expression and reversal of drug resistance. Cytometry 1998;32:86-
- 19. Sabri S, Richelme F, Pierres A, Benoliel AP, Bongrand P. Interest of image processing in cell biology and immunology. J Immunol Meth 1997:208:1~27.
- 20. Dellian M, Helmlinger G, Yuan F, Jain RK. Fluorescent ratio imaging, of interstitial pH in solid tumors: effect of glucose on spatial and temporal gradients. Br J Cancer 1996;74:1206-1215.

- 21. Malpica N, deSolorzano CO, Vaquero JJ, Santos A, Valicorba I, Garcia-Sagredo JM, delPozo F. Applying watershed algorithms to the seg-mentation of clustered nuclei. Cytometry 1997;28:289-297.
- 22 Mosedale DE, Metcalfe JE, Grainger DJ. Optimization of immunofluorescence methods by quantitative image analysis. J Histochem Cytochem 1996;44:1043-50.
- Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-color confocal images. J Microsc 1993;169:375-82.
- 24. Beiloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P, Lacombe F. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. Cytometry 1994;17:59–65. Feller N, Kuipper CM, Lankelma J, Ruhdai JK, Scheper RJ, Pinedo HM, Broxterman HJ. Functional detection of MDR1/P170 and MRP/190-
- 25. mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry. Br J Cancer 1995;72:543-549.
- Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated 26 with multidrug resistance in mammalian cell lines. Science 1983;221: 1085-1088.
- Dalton WS, Grognan TM, Rybski JA, Scheper RJ, Richter L, Kailey J, 27. Broxterman HJ, Pinedo HM, Salmon SE. Immunohistochemical detection and quantification of P-gp in multiple drug resistant human myeloma cells association of drug resistant and drug accumulation. Blood 1989,1731:747-752.
- Bennis S, Ichas F, Robert J. Differential effects of verapamil and quinine on the reversal of doxorubicin resistance in a human leukemia cell line. Int J Cancer 1995;62:283-290.
- 29.Merlin JL, Guerci AP, Marchal S, Bour C, Colosetti P, Kataki A, Guerci O. Influence of SDZ-PSC833 on daunorubicin intracellular accumulation in bone marrow specimens from patients with acute myeloid tion in Done matrow specificity from parameters and parameters in the parameters and parameters.
- study on reversal efficacy of SDZ PSC 833, cyclosporin A and verapamil on multidrug resistance in vitro and in vivo. Acta Oncol 1995; 34:235-241.
- 31. Matsumoto B. Methods in cell biology, Vol. 38. San Diego: Academic
- Van Oostveld P, Verhaegen F, Messen K. Heterogeneous photo-bleaching in confocal microscopy caused by differences in refractive 32. index and excitation mode. Cytometry 1998;32:137-146.
- Manders EMM. Chromatic shift in multicolour confocal microscopy. J 33. Microsc 1996;185:321-328.
- Török P, Hewlett SJ, Varga P. The role of specimen-induced spherical aberration in confocal microscopy. J Microsc 1997;188:158-172. Gramain MP, Bour C, Chomik A, Dieterlin A, Haeberlé O, Meyer JJ,
- 35. Marchal S, Merlin JL, Guillemin F. Fluorescence microscopy image deconvolution: application to anthracycline distribution in breast cancer cells. SPIE Intern Soc Opt Engin 1997;3197:187-193.
- Marquardt D, Center MS. Drug transport mechanisms in HL60 cells isolated for resistance to adriamycin: evidence for nuclear drug accumulation and redistribution in resistant cells. Cancer Res 1992;52: 3157-3163.
- Schindler M, Grabski S, Hoff E, Simon SM. Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7adr). Biochemistry 1996;35: 2811-2817
- 38. Benderra Z, Morjani H, Trussardi A, Manfait M. Role of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in daunorubicin distribution in etoposide-resistant MCF7 cells overexpressing the multidrug-resistance associated protein. Int J Oncol 1998;12:711-715.
- 39. Molinari A, Cianfriglia M, Meschini S, Calcabrini A, Arancia G. Pglycoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells. Int J Cancer 1994;59:789-795
- 40. Shapiro AB, Fox K, Lee P, Yang YD, Ling V. Functional intracellular P-glycoprotein. Int J Cancer 1998;76:857-864.
- Merlin JL, Wihlidal A, Kataki A, Ramacci C, Marchal S, Poullain MG. Synergistic modulation of multidrug resistance by associations of modulators with different mode of action. Proc Am Assoc Cancer Res 1996:37:316.
- 42. McNally JG, Preza C, Conchello JA, Thomas LJJ. Artifacts in computational optical-sectioning microscopy. J Opt Soc Am 1994;11:1056-1067.



Figure 17 : Evolution de la distribution intracellulaire de la daunorubicine à 2  $\mu$ M pour la lignée MCF-7, aux temps d'incubation suivants : a) 15 min, b) 60 min, c) 180 min Les images a'), b'), and c') illustrent les résultats obtenus après déconvolution des images a), b), et c) par l'algorithme du *MAP* après 10 itérations (Gramain et al., 1997).

# 4. Discussion-Conclusions

Le phénotype MDR associé à la résistance aux anthracyclines implique souvent l'activité des pompes à efflux telles que la P-gp et/ou la MRP. Leur phénotype se caractérise classiquement par l'efflux hors des cellules des molécules cibles. La séquestration cytoplasmique des anthracyclines est également souvent associée au phénotype de résistance de la MRP et plus récemment de la P-gp.

L'étude des sites de séquestration cytoplasmique de la DNR a été effectuée par double marquage associé à des traitements et analyses d'images 2D obtenues par microscopie de fluorescence conventionnelle. Cette méthode a permit de déterminer l'appareil de Golgi comme site majeur (65%) de séquestration de la DNR pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> ainsi que des compartiments acides (35%) tels que les lysosomes ou endosomes (Bour-Dill et al., 2000). De récents travaux ont montré que la P-gp pouvait être localisée dans différents compartiments cellulaires tels que l'appareil de Golgi (Molinari et al., 1994) ou le noyau (Shapiro et al., 1998), son rôle consisterait à participer au trafic cellulaire vers la membrane cytoplasmique

(Labroille et al., 1998). Nos travaux confirment que la présence de la P-gp au niveau de l'appareil de Golgi pourrait impliquer la séquestration cytoplasmique de la DNR pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. La méthode développée est rapide et facilement accessible, car elle comprend des traitements et analyses d'images classiques en microscopie de fluorescence conventionnelle. Le caractère restrictif des applications est le fait du dispositif instrumental conventionnel, qui implique la formation d'images contaminées par le bruit issu des plans hors focalisation.

C'est pourquoi, les techniques paraconfocales sont une alternative séduisante. L'application de l'algorithme de déconvolution du *maximun a posteriori* (*MAP*) sur les images 2D a permis d'améliorer la qualité des images sans en altérer l'information quantitative des niveaux de gris. Ces améliorations permettent de faciliter les traitements et analyses d'images dont l'objet serait la segmentation. Faciliter la segmentation est particulièrement intéressant pour discriminer le contour cellulaire lorsque le marqueur fluorescent est de faible intensité ou de faible contraste, ou un élément intracellulaire à condition que le marquage ne soit pas trop diffus dans l'ensemble de la cellule. Toutefois l'évolution vers l'acquisition d'images en 3 dimensions permet, par déconvolution 3D, de restaurer les images obtenues en microscopie conventionnelle (Gramain, 2000). Les travaux de *M.P. Gramain* ont permis de caractériser notre dispositif instrumental en 3 dimensions, puis d'effectuer les premières applications de la déconvolution 3D sur billes fluorescentes (Gramain, 2000).

## 5. Microspectrofluorimétrie de la daunorubicine intracellulaire in vitro

Le double marquage et l'analyse d'images ont mis en évidence le compartiment golgien comme région d'intérêt de la distribution subcellulaire de la DNR. Les mesures des spectres de fluorescence ont pour objectif de comparer la configuration moléculaire de la DNR, dans le compartiment cytoplasmique des lignées MCF-7 et MCF-7<sup>DXR</sup>.

Dans un premier temps, le spectre d'émission de fluorescence de la DNR a été mesuré en *solution aqueuse*. Puis les spectres de DNR ont été mesurés par microspectrofluorimétrie pour les *lignées MCF-7 et MCF-7<sup>DXR</sup>* ayant incorporées la DNR à 20  $\mu$ M. Cette concentration permet de conserver des conditions comparables à celles utilisées pour le double marquage.

5.1. Comparaison de spectres de fluorescence de différentes anthracyclines en solution

Les trois anthracyclines suivantes ont été analysées : la daunorubicine (DNR), l'épirubicine (EPI) et l'idarubicine (IDA). Cette étude comparative permet de mesurer l'impact de la structure des molécules sur leur propriété d'émission de fluorescence.

Les mesures en absorbance, effectuées en triplicata en solution aqueuse (2, 5, 10, 15 et 20  $\mu$ M) permettent par l'intermédiaire de l'équation 1. de calculer le coefficient d'extinction molaire correspondant :  $A = \varepsilon \times c \times l$  (équation 1.)

A : absorbance ;  $\varepsilon_X$  : coefficient d'extinction molaire au pic d'absorption (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) ; c : concentration molaire (M) et l : largeur de la cuve (1 cm)

Les coefficients obtenus en solution aqueuse respectivement à 476, 475 et 474 nm pour la DNR, l'EPI et l'IDA sont les suivants : 9300, 11900 et 8900 ( $M^{-1}$ cm<sup>-1</sup>). Ces coefficients permettent de contrôler les concentrations en solution.

Les spectres d'émission de fluorescence ont été mesurés, aux longueurs d'onde d'excitation maximales respectives des différentes anthracyclines, afin de satisfaire deux objectifs. Le premier objectif est d'obtenir un spectre de référence de la DNR. Le second objectif consiste à comparer les spectres normalisés pour des molécules de structures et de propriétés de fluorescence très proches.

En solution aqueuse à 20  $\mu$ M, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration. Les spectres de fluorescence des trois anthracyclines ont les caractéristiques communes suivantes : un pic d'émission de fluorescence entre 560 et 594 nm ainsi qu'un épaulement du spectre entre 545 et 560 nm (*Figure 18*). L'intensité de fluorescence de l'IDA, par rapport à la DNR et l'EPI, révèle un rendement quantique de fluorescence respectivement 2,5 à 2,2 fois plus important pour l'IDA. L'IDA présente un décalage du pic d'émission de fluorescence par rapport à la DNR et l'EPI vers le bleu et se caractérise par un ratio de fluorescence de  $\rho_{545/558} = 0,90$ . Par contre l'EPI et la DNR ont des caractéristiques proches. Comme les spectres normalisés à la longueur d'onde d'émission de fluorescence maximale reflètent les spectres de fluorescence, et qu'il ne s'agit pas de déterminer la concentration de la DNR, les spectres intracellulaires de fluorescence de la DNR seront normalisés en fonction de l'intensité relevée à 594 nm.



Figure 18 : Comparaison de spectres d'émission de fluorescence obtenus dans de l'eau pour la DNR, l'EPI et l'IDA déterminés à une concentration de 20  $\mu$ M ( $\lambda_{exc}$  : 476 nm) : A), spectres brutes (Unité Arbitraire) ; B) Le ratio de fluorescence ( $\rho$ ) correspond à la normalisation des intensités de fluorescence par rapport à l'intensité du pic de fluorescence de la DNR (594 nm).

5.2. Comparaison de spectres de fluorescence de la daunorubicine intracellulaire

Les spectres de fluorescence de la DNR ont été comparés pour les lignées cellulaires MCF-7 et MCF- $7^{\text{DXR}}$ . Après soustraction de l'autofluorescence, la contribution spectrale de la DNR et le ratio  $\rho_{560/594}$  ont été calculés. La *Figure 19* illustre les spectres, normalisés par rapport à l'intensité de fluorescence mesurée à 594 nm, obtenus pour les deux lignées au niveau du compartiment golgien après 2 h ou 24 h d'incubation à 20  $\mu$ M.

*Après 2 h d'incubation* les spectres de fluorescence de la DNR diffèrent entre la lignée MCF-7 et la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> (*Figure 19*). Le spectre de la DNR pour la lignée MCF-7 diffère du spectre obtenu dans de l'eau principalement par un épaulement quasiment inexistant entre 545 et 560 nm alors qu'apparaît un épaulement entre 620 et 650 nm. Par contre, pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> le spectre de la DNR est proche du spectre obtenu en solution aqueuse.

*Après 24 h d'incubation* les spectres de fluorescence de la DNR restent relativement différents entre la lignée MCF-7 et la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> (*Figure 19*). Pour les deux lignées, l'épaulement entre 545 et 560 nm est plus résolu et apparaît désormais comme un second pic de fluorescence à 548 nm. Pour la lignée MCF-7, ce pic est mineur alors qu'il apparaît prépondérant pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. En outre, l'épaulement entre 620 et 650 nm est mineur pour les deux lignées.



Figure 19 : Spectres normalisés de fluorescence de la DNR à 20  $\mu$ M obtenus au niveau du compartiment golgien pour les lignées MCF-7 et MCF-7<sup>DXR</sup> (PB 460-490 nm). Le ratio de fluorescence ( $\rho$ ) correspond à la normalisation des intensités de fluorescence par rapport à l'intensité du pic de fluorescence de la DNR (594 nm) : Spectres après 2 h d'incubation (graphe du haut) ; Spectres après 24 h d'incubation (graphe du bas).

Pour la lignée MCF-7, la Figure 20A montre qu'il n'y a pas de modification, en fonction du compartiment cellulaire, du spectre normalisé de la DNR après 2 h d'incubation à 20  $\mu$ M. Pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>, la Figure 20B met en évidence des variations plus importantes des profils spectraux de la DNR dans les différents compartiments. Les principales modifications concernent la région spectrale au delà de 600 nm avec l'apparition de deux pics de fluorescence supplémentaires respectivement à 622 et 700 nm.



Figure 20 : Spectres normalisés de fluorescence de la DNR (PB 460-490 nm), après 2 h d'incubation à 20  $\mu$ M, obtenus au niveau de différentes régions intracellulaires d'intérêt pour les lignées MCF-7 (A) et MCF-7<sup>DXR</sup> (B).

Les mesures de spectres de la DNR, en fonction du temps et du compartiment cellulaire, pour les deux lignées cellulaires indiquent que la région d'intérêt se situe dans le compartiment golgien principalement entre 545 et 594 nm. C'est pourquoi deux ratios ont été calculés pour les spectres de DNR mesurés dans le compartiment golgien ( $\rho_{548/594}$  et  $\rho_{560/594}$ ), puis confrontés aux ratios calculés pour le spectre de la DNR en solution aqueuse (*Tableau 12*).

DNR	ρ5	60/594	ρ548/594		
Golgi	MCF-7	MCF-7 <sup>DXR</sup>	MCF-7	MCF-7 <sup>DXR</sup>	
2 h	0,43	0,75	0,30	0,65	
24 h	0,64	0,83	0,69	0,95	
EAU	0,75		0,60		

Tableau 12 : Ratio de fluorescence de la DNR ( $\rho_{560/594}$  et  $\rho_{548/594}$ ) obtenus dans de l'eau et au niveau de la région golgienne pour les deux lignées après 2 ou 24 h d'incubation.

*Pour la lignée MCF-7*, les deux ratios calculés pour le spectre de la DNR, mesurés dans le compartiment golgien, sont inférieurs à ceux obtenus en solution aqueuse. Après 24 h d'incubation avec la DNR les deux ratios calculés augmentent, mais seul le ratio  $\rho_{548/594}$  est supérieur au ratio calculé pour le spectre de la DNR en solution aqueuse (0,69 vs 0,60).

*Pour la lignée MCF-7*<sup>DXR</sup>, les deux ratios calculés pour le spectre de la DNR, mesurés dans le compartiment golgien, sont supérieurs à ceux obtenus pour la lignée MCF-7 quel que soit le temps d'incubation. Après 2 h d'incubation avec la DNR les deux ratios calculés sont proches des ratios calculés pour les spectres de la DNR en solution aqueuse. Après 24 h d'incubation avec la DNR, les deux ratios augmentent mais l'apparition du pic de fluorescence à 548 nm se traduit par une augmentation du ratio  $\rho_{548/594}$  qui est 1,6 fois supérieur à celui calculé en solution (0,95 *vs* 0,60).

# 5.3. Discussion-Conclusions

Les spectres de fluorescence de la DNR ont été mésurés en solution aqueuse et au niveau intracellulaire pour les lignées MCF-7 et MCF-7<sup>DXR</sup>. Les ratios entre pics de fluorescence d'intérêt reflètent les interactions des molécules fluorescences entre elles ou avec leur environnement proche. En solution, le ratio de fluorescence ( $\rho_{560/590}$ ) de la DNR est constant dans l'éthanol et correspond à un état monomère de référence (Laigle et al., 1996). En solution aqueuse (avec ou sans ADN) existe un équilibre entre espèces monomères et dimères. Le ratio de fluorescence diminue pour les fortes concentrations d'anthracycline, traduisant un phénomène croissant d'association entre elles (Laigle et al., 1996). Dans des systèmes lipidiques tels que les liposomes, le ratio diminue avec l'augmentation du rapport [phospholipide-anthracycline], reflétant des interactions entre anthracycline et lipide (Gallois et al., 1996).

Les ratios obtenus en solution aqueuse à 20 µM (p<sub>560/594</sub>) sont cohérents avec les travaux de Gallois et al. (Gallois et al., 1996) puisque pour la DNR et l'IDA les ratios ( $\rho_{560/590}$ ) sont respectivement de 0,79 et 0,85 à des concentrations inférieures à 100 µM. Pour la lignée MCF-7 dans le compartiment golgien, et quel que soit le temps d'incubation, les spectres d'émission de fluorescence de la DNR sont caractérisés par des ratios p<sub>560/594</sub> inférieurs à ceux obtenus pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> (2 h : 0,43 vs 0,75 et 24 h : 0,64 vs 0,83). Belhoussine et al. ont obtenu la même tendance pour la THP-DXR après 1 h d'incubation pour différents couples de lignées cellulaires (LR73 : 0,5 et LR73R : 0,85 pour  $\rho_{550/600}$ ) (Belhoussine et al., 1998). Les ratios p<sub>560/594</sub> obtenus au niveau intracellulaire peuvent être comparés aux ratios obtenus dans des systèmes lipidiques comme les liposomes (Gallois et al., 1996). Cependant, la composition lipidique varie en fonction des cellules de phénotype sensible et MDR. Les cellules MDR enrichies en différents composants lipidiques (cholestérol, sont glycosphyngolipide et sphingomyéline) (Lavie et al., 1999). Pour la lignée MCF-7, le ratio  $\rho_{560/594}$  de la DNR après 24 h d'incubation augmente (0,64) pour devenir proche du ratio de la DNR obtenu pour les liposomes avec une forte concentration de phospholipide mais sans cholestérol (0,66) (Gallois et al., 1996). Alors que pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> les ratios p<sub>560/594</sub> de la DNR obtenus au niveau du compartiment golgien après 2 et 24 h d'incubation (respectivement 0,75 et 0,83) sont proches des ratios de la DNR obtenus pour les liposomes avec une faible concentration de phospholipide mais avec cholestérol (Gallois et al., 1996). Les travaux de Belhoussine et al. confirment la particularité des interactions entre anthracycline (THP-DXR) et composant lipidique. Le ratio p550/600 mesuré pour un modèle constitué de complexes [THP-DXR-sphingomyéline] (0,90) est comparable à celui obtenu au niveau de la région golgienne de la lignée cellulaire de phénotype MDR (0,85) (Belhoussine et al., 1998). Les résultats par dichroisme circulaire dans les liposomes montrent un état monomère pour la DNR quelle que soit la concentration de lipide (Gallois et al., 1998). Par contre, la nature des interactions varie en fonction de la concentration lipidique, elles sont électrostatiques pour les fortes concentrations, comme pour des lignées sensibles, et (électrostatiques+hydrophobes) pour les faibles concentrations, comme pour des lignées de phénotype MDR (Gallois et al., 1998).

L'ensemble des expérimentations effectuées sur l'altération de la distribution de la DNR pour ce modèle cellulaire adhérant résistant suggère la séquestration de la DNR dans le compartiment golgien. A la séquestration de la DNR s'associent des modifications des propriétés spectrales de fluorescence de la DNR, qui semblent traduire la formation de complexes DNR-lipide dans le compartiment golgien.

# 6. Réversion du phénotype MDR par chimiomodulation in vitro

L'ensemble des méthodes ainsi que les résultats obtenus dans cette problématique ont fait l'objet d'une publication (Merlin et al., 2000) qui est intégrée dans les pages suivantes.

*BUT* : afin de réverser le phénotype MDR induit par la surexpression de la P-gp, différents composés ont été évalués pour leur propriété d'inhibition de la P-gp. Le S9788 et le PSC-833 sont des inhibiteurs de P-gp qui se sont révélés actifs au niveau de la distribution subcellulaire de la DNR, impliquant différentes cibles potentielles. De ce fait, des combinaisons de S9788 et de PSC-833 ont été appliquées pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. Cette lignée correspond à un modèle cellulaire aussi bien d'efflux que de séquestration cytoplasmique de la DNR.

La modulation de la résistance a été étudiée pour des combinaisons des fractions complémentaires de concentrations équitoxiques permettant 90% (IEC90) ou 50% (IEC50) de réversion de la résistance à la DNR pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. L'évaluation de l'effet de ces applications de modulateurs a été réalisée par : i) des tests de réversion de résistance *cytotoxicité* à la DNR, ii) la détermination de l'*incorporation* intracellulaire de la DNR par cytométrie en flux, iii) la *distribution* subcellulaire de la DNR par microscopie de fluorescence et enfin par iv) l'évaluation de *l'expression de gènes* MDR par RT-PCR semi-quantitative.

*RESULTATS* : les deux modulateurs, le S9788 et la PSC-833, sont de puissants inhibiteurs de la P-gp permettant d'obtenir l'IEC90, respectivement à 5 et 15  $\mu$ M, et l'IEC50 respectivement à 0,1 et 0,2  $\mu$ M. Lorsque les deux composés sont combinés, ils restaurent la cytotoxicité de la DNR selon un procédé synergique, que ce soit à l'IEC90 ou à l'IEC50. Toutefois, seules les combinaisons des modulateurs permettant d'obtenir l'IEC90 augmentent la fluorescence intracellulaire de la DNR selon une modalité synergique. Concernant les combinaisons permettant d'obtenir l'IEC50, aucune augmentation de la fluorescence intracellulaire de la DNR n'a été détectée, pourtant les images de distribution de la fluorescence intracellulaire de la DNR suggèrent que la séquestration cytoplasmique de la DNR au niveau de l'appareil de Golgi est modulée dans ces conditions. Les résultats obtenus en immunofluorescence et RT-PCR concernant la MRP, la LRP ou l'ARA ont montré qu'elles n'étaient pas impliquées dans le phénotype de résistance à la DNR pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>.

*CONCLUSIONS* : l'intérêt de ces combinaisons synergiques du S9788 et du PSC-833 pourrait se traduire à terme par la réduction de la toxicité souvent induite par les fortes doses appliquées pour inhiber la P-gp, sans toutefois altérer l'efficacité de la modulation de la résistance aux anthracyclines.

109

# Modulation of Daunorubicin Cellular Resistance by Combination of P-Glycoprotein Blockers Acting on Drug Efflux and Intracellular Drug Sequestration in Golgi Vesicles

Jean-Louis Merlin,<sup>1\*</sup> Corinne Bour-Dill,<sup>1</sup> Sophie Marchal,<sup>1</sup> Carole Ramacci,<sup>1</sup> Marie-Gwenaelle Poullain,<sup>2</sup> and Bruno Giroux<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, Vandœuvre-les-Nancy cedex, France <sup>2</sup>Institut des Recherches Internationales Servier, Courbevoie cedex, France

Received 2 September 1999; Revision Received 20 April 2000; Accepted 18 May 2000

**Background:** S9788 and PSC833 were developped as P-glycoprotein (Pgp) blockers and found to act additionally on daunorubicin subcellular distribution, involving different putative targets. On this basis, combinations of S9788 and PSC833 were evaluated in Pgp-expressing  $MCF7^{DXR}$  cells in which we recently demonstrated that daunorubicin was sequestered in Golgi vesicles (Bour-Dill et al.: Cytometry, 39: 16–25, 2000).

**Methods:** Combinations of S9788 and PSC833 consisted in complementary fractions of iso-effective concentrations (IEC) leading to 90% (IEC90) and median (IEC50) reversion of daunorubicin resistance. Resistance modulation was assessed using cytotoxicity assays, flow cytometry determination of intracellular daunorubicin, and fluorescence microscopy analysis of daunorubicin subcellular distribution.

**Results:** Individually, both S9788 and PSC833 were found to be very potent with IEC90 of 5 and 15  $\mu$ mol/l, and IEC50 of 0.1 and 0.2  $\mu$ mol/l, respectively, for S9788 and PSC833. When combined, synergistic cytotoxicity was observed for both IEC90 and IEC50 combinations while

Resistance of cancer cells is a crucial problem in chemotherapy because it induces treatment failures. The multidrug resistance phenotype is associated with the overexpression of transmembrane P-glycoprotein (Pgp), generating a broad pattern of resistance to a number of unrelated drugs by inducing a dramatic reduction of their intracellular accumulation (1). More recently, cytoplasmic location of Pgp was reported (2); and in multidrug resistant K562 leukemic cells (3), Pgp was found to be largely (up to 50%) located in the cytoplasm as a storage pool able to maintain steady-state levels of membrane Pgp. In some cell lines, multidrug resistance-associated protein (MRP) (4), and major vault lung-resistance protein (LRP) (5) were found to be implicated in anthracycline resistance. More recently, a novel protein belonging to the ATP-binding intracellular daunorubicin fluorescence was only synergistically increased for IEC90 combinations. For IEC50 combinations, no increase in intracellular fluorescence was observed, and fluorescence microscopy examination of the cells suggested that daunorubicin sequestration in Golgi vesicles could be modulated at concentrations that do not significantly increase daunorubicin cellular concentration. Using immunofluorescence and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses, multidrug resistance-associated protein, major vault lung-resistance protein, and anthracycline-resistance associated protein were not found to be implicated.

**Conclusions:** Synergistic combinations of S9788 and PSC833 might offer alternative ways to decrease the toxicity generated by high-dose Pgp-blockers without altering the efficacy of the resistance modulation. Cytometry 41: 62–72, 2000. © 2000 Wiley-Liss, Inc.

**Key terms:** multidrug resistance; P-glycoprotein; S9788; PSC833; anthracyclines; daunorubicin

cassette protein family, named the anthracycline resistance-associated protein (ARA), was also reported to be involved in anthracycline resistance. The close proximity of MRP and ARA genes on chromosome 16 (16p13) strongly suggest that the two genes could be coamplified and contribute to MRP-related resistance (6).

Grant sponsors: Institut des Recherches Internationales Servier, French Ligue Nationale contre le Cancer, Groupe Inter-Régional de Recherche en Cancérologie, Alexis Vautrin Cancer Center.

<sup>\*</sup>Correspondence to: J. L. Merlin, Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-les-Nancy cedex, France.

E-mail: jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

Many compounds were evaluated for Pgp-mediated resistance modulation but most of them failed to be usable in vivo because their modulating activity appeared at concentrations generating toxic side effects. More recently, second-generation multidrug resistance modulators were designed to avoid this inconvenience, and compounds such as the triazinopiperidine derivative \$9788 (7-9), and the nonimmunosuppressive cyclosporine derivative PSC833 (10-13) were developed and evaluated in clinical trials (14-16). In addition to Pgp-dependent drug efflux, multidrug resistance phenotype was also reported to be associated with some alteration of intracellular drug distribution with diversion of the drug from its nuclear target sites of action (17). Our recent results (18), using fluorescence microscopy image analysis, identified daunorubicin intracellular sequestering vesicles as Golgi vesicles.

Our previous results (19) showed that \$9788 modulates the intracellular accumulation of daunorubicin. We further suggested that the subcellular targets located in the membrane of vesicular systems are involved in the protection of specific intracellular or nuclear targets in resistant cells-as already suggested for verapamil and daunorubicin (20). Another article (21) reporting multiparametric image analysis showed that the resistance phenotype was also associated with some subcellular alterations, leading to the modification of the densitometry, texture, and morphology of the cells. In these experiments, \$9788 restored all these parameters to the level observed in sensitive cells. In 1994, Ross et al. (22) reported synergistic reversal of multidrug resistance phenotype in resistant cells from patients with acute leukemia by combining cyclosporin A and Cremophor EL.

Hwang et al. (23) reported that combinations of suboptimal concentrations of Pgp blockers exerted additive modulation of multidrug resistance phenotype in cell models from hematologic or solid tumor origin. In this article, verapamil, PSC833, and Cremophor EL were evaluated and their respective mechanisms of action were found to involve different biophysical effects on the cell membranes as well as alterations of the intracellular metabolism. Evidence for involvement of the membrane ceramide generation pathway, implicated in daunorubicininduced apoptosis (24,25), during multidrug resistance modulation by PSC833 was recently reported (26).

Our previous results (27) showed that PSC833 was active on intracellular vesicles located close to the Golgi apparatus. Therefore, and because of their multiple mechanisms of action, it appears interesting to investigate combinations of Pgp blockers also acting via different subcellular mechanisms. The potential implication of some alteration of MDR1 and MRP gene expression was also envisaged because suppression of mdr1 gene activation by Pgp blockers was already reported (28).

## MATERIALS AND METHODS Drugs

Doxorubicin was purchased from Pharmacia (St Quentin en Yvelines, France) and daunorubicin from Rhône Poulenc Rorer Bellon (Neuilly, France). Stock solutions (4 mmol/l) of both drugs were prepared in sterile water then diluted in serum-free culture medium. S9788 was obtained from Institut des Recherches Internationales Servier (Courbevoie, France) and PSC833 from Novartis (Basel, Switzerland). PSC833 was first solubilized in ethanol. Therefore, control experiments always included samples treated with equivalent ethanol concentration.

#### Cell Lines

MCF7 human breast adenocarcinoma cell line and its subline MCF7<sup>DXR</sup> (29) displaying resistance to doxorubicin were cultured at 37°C in phenol red-free RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (Costar France, Dutscher, Brumath, France) in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The resistant subline, MCF7<sup>DXR</sup>, was maintained in 10 µmol/l doxorubicin-containing medium. A 24-h wash-out period in doxorubicin-free medium was applied before starting the experiments. For all experiments, daunorubicin was prefered to doxorubicin, because of its quicker cellular internalization, reaching steady-state within 2 h at 37°C (unpublished data). In MCF7<sup>DXR</sup> cell line, in addition to Pgp-mediated drug efflux, daunorubicin was found to be sequestered in Golgi vesicles (20).

Pgp, MRP, and LRP protein expression in the resistant cells were investigated using flow cytometry (OrthoCyte, OrthoDiagnostic Systems, Roissy, France) by immunolabeling using UIC2 (Immunotech, Marseilles, France), QCRL1 (Centocor, Malvern, PA, USA), and LRP56 (Tebu, Le Plessy en Yvelines, France) monoclonal antibodies, respectively. UIC2 labeling was performed using the experimental procedure reported in our previous article with MRK16 monoclonal antibody (19); QCRL1 and LRP56 labelings were achieved according to Flens et al. (4), followed by labeling with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat antimouse IgG serum (Sigma) for 30 min at 4°C. Flow cytometry analyses were performed on at least 5,000 cells.

MDR1, MRP, and ARA mRNA expression were analyzed using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was isolated using TRIzol Reagent (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) then RNA (1 µg) was reverse transcribed using Superscript II enzyme (200 units; Life Technologies) and random hexanucleotides primers (Life Technologies). For MDR1 and MRP mRNA expression analysis, a cDNA amount corresponding to 50 ng of RNA was submitted to PCR for 26 cycles using a Crocodile II thermocycler (Appligene, Illkirch, France) in a final volume of 50 µl using 5 units of DNA Taq-polymerase (Eurobio, Les Ulis, France). Following an initial denaturation for 3 min at 93°C, annealing for 1 min at 55°C, synthesis for 1.5 min at 72°C, each cycle consisted of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C, and 90 s at 72°C. A final synthesis step was run for 10 min at 72°C. GAPDH gene was coamplified with MDR1 (30) and MRP (31) in the same reaction using the following primers (Eurogentec, Seraing, Belgium):

• MDR1 forward primer: 5'-CCCATCATTGCAATAGC-AGG-3'

• MDR1 reverse primer: 5'-GTTCAAACTTCTGCTCC-TGA-3'

• MRP forward primer: 5'-TCTCTCCCGACATGACCG-AGG-3'

• MRP reverse primer: 5'-CCAGGAATATGCCCCGA-CTTC-3'

• GAPDH forward primer: 5'-TGGGGAAGGTGAAG-GTCGGA-3'

• GAPDH reverse primer: 5'-GAAGGGGTCATTGATG-GCAA-3'.

The expected PCR product sizes were 157, 140, and 110 base pairs, respectively. Aliquots (5  $\mu$ l) of the PCR products were analyzed using 2% agarose gel electrophoresis (ICN Pharmaceuticals, Orsay, France) containing ethidium bromide (50 ng/ml). Bands were visualized by UV transillumination and quantification was performed using GelDoc1000 system (BioRad, Ivry sur Seine, France). Relative expression ratios (RER) were calculated by dividing the fluorescence intensity of the target gene band by that of the control gene band.

ARA mRNA expression analysis was assessed according to an experimental procedure adapted from O'Neill et al. (6). Fifteen  $\mu$ l cDNA aliquots were used for hot start PCR using the primer pairs for ARA (forward primer 5'-ACAC-CCATTGGTCACCTGCTA-3' and reverse primer 5'-GGT-CACCTGGAGGGCAGCAGAGAC-3'). PCR constituents were incubated in mineral oil for 5 min at 95°C then 1.25 unit of DNA Taq-polymerase (Life Technologies) was added to each reaction. PCR protocol consisted of 2.5 min at 95°C, 3 min at 65°C, and 5 min at 72°C for 1 cycle; 45 s at 95°C, 1 min at 65°C, and 1 min at 72°C for 35 cycles; then 10 min at 72°C.

Beta-2 microglobulin (forward primer 5'-ACCCCCACT-GAAAAAGATGA-3'; reverse primer 5'-ATCTTCAAACCTC-CATGATG-3') was amplified as control in separate reactions. Negative controls consisted of PCR reagents substituted for template DNA. PCR products were analyzed by electrophoresis through ethidium bromide-stained 1% agarose gels (Metaphor agarose, Bioproducts, Rockland, Maine, USA) and visualized by UV transillumination.

#### Cytotoxicity Assays

Cytotoxicity assays were performed using (4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) as previously described (32). Briefly, cell suspensions containing  $2 \times 10^4$  viable cells/ml were plated into 96-well dishes and allowed to attach for 48 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The culture medium was then removed and the cells were incubated for 2 h at 37°C in culture medium containing daunorubicin. When tested, Pgp-modulating agents were added concomitantly with daunorubicin. After this incubation period, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and allowed to grow for 48 h in culture medium.

MTT (final concentration 5 µmol/l) was then added to each well and the dishes were incubated for 3 h at 37°C to allow MTT metabolization into formazan crystals. The crystals were finally solubilized by adding 50 µl of 25% sodium dodecylsulfate solution into each well. Blank control wells with no cells received the same reagents. When Pgp-modulating agent was solubilized in ethanol, blank control wells received ethanol at equivalent concentration. Absorbance was finally measured at 540 nm using a Multiskan MCC340 plate reader (Flow Laboratories). Absorbance of blank control was substracted from the absorbance values in the other wells. Concentrations inhibiting 50% (IC50) of the growth of resistant cells were calculated using the median effect analysis (33) and compared to those achieved with the sensitive cells. The resistance index was calculated by dividing the IC50 of resistant cells with that of the parental sensitive cells. The modulating activity of \$9788 and PSC833 was normalized to the sensitivity of MCF7 and MCF7<sup>DXR</sup> cells: "0" being lack of modulation, i.e., no significant difference in IC50 as compared to MCF7<sup>DXR</sup>-resistant cells; "1" being complete reversion of resistance, i.e., no significant difference in IC50 as compared to MCF7-sensitive cells.

#### Intracellular Daunorubicin Accumulation

Based on previous results demonstrating that intracellular daunorubicin fluorescence (IDF) correlated with <sup>3</sup>Hdaunorubicin accumulation (21), IDF was determined using flow cytometry on cell suspensions obtained after trypsinization (trypsine/EDTA, Life Technologies), containing 10<sup>6</sup> cells/ml using an Orthocyte flow cytometer (Ortho Diagnostic Systems) as already reported (21). IDF was determined by incubating the cells with 2 µmol/l daunorubicin for 2 h at 37°C. When tested, Pgp-blockers were added concomitantly with daunorubicin during the 2 h incubation period. Dead, i.e., membrane-altered, cells were identified by incubating the cells in 75 µmol/l propidium iodide (PI) for 10 min at 4°C. Logarithmic amplification was used to easily monitor simultaneously the two fluorescence signals of daunorubicin and PI using the orange/red fluorescence detector fitted with 560 nm longpass filter as illustrated in our previous article (21). The modulating activity of \$9788 and PSC833 was normalized to the IDF values measured in MCF7 and MCF7<sup>DXR</sup> cells: "0" being lack of modulation, i.e., no significant difference in IDF as compared to MCF7<sup>DXR</sup>-resistant cells; "1" being complete reversion of resistance, i.e., no significant difference in IDF as compared to MCF7-sensitive cells.

#### Daunorubicin Subcellular Distribution

Daunorubicin subcellular distribution was analyzed using fluorescence microscopy as already reported (18). Briefly, cells were cultured in Slideflask (Nunc, Polylabo, France) to maintain adhesive living cells in their biologic environment during observation. In addition, this procedure considerably reduced the thickness of the specimen and, thus, out-of-focus information during epifluorescence observations. Cells were incubated for 2 h at 37°C with 2

64

 $\mu mol/l$  daunorubicin alone, or simultaneously with modulators, then washed with PBS and immediately observed.

Intracellular daunorubicin distribution was studied using fluorescence microscopy (AX70 PROVIS upright epifluorescence microscope, Olympus, France), equipped with a 100-W mercury vapor lamp. Filter set for daunorubicin fluorescence consisted of 460-490 nm band-pass excitation filter, 570 nm dichroic mirror, and 590 nm long-pass barrier filter. High numerical aperture (1.35),  $100 \times$  and  $40 \times$  oil-immersion plan apochromatic objectives (i.e., corrected for spherical and chromatic aberrations) were used for all experiments.

Fluorescence images were recorded using Peltier cooled CCD camera (LH1600, Lhesa Electronique, France) with strictly controlled 4 s integration time. The high sensitivity and the wide dynamic range allowed rational comparative image analysis for both cell lines and each treatment. The pixel size was  $9 \times 9 \ \mu\text{m}^2$  and the total image size was  $1536 \times 1024$  pixels. Fluorescence images were eight-bit encoded and processed using AnalySIS Pro software (SIS, Germany). No interfering autofluorescence signal was recorded in these experimental conditions. Grey level image analysis assuming fluorescence intensity was performed as previously described (20).

#### **Combination of Modulating Agents**

Combinations of modulating agents were set as complementary fractions of isoeffective concentrations (IEC) leading to median and 90% reversion of daunorubicin resistance in Pgp-expressing cells as determined from cytotoxicity assays. For example, median modulating activity, i.e., decrease in 50% of the initial resistance index, was achieved for S9788 and PSC833 at 0.1 and 0.2  $\mu mol/l,$ respectively (IEC50). Therefore, five combinations between these two drugs were calculated as 90%  $\mathrm{IEC50}_{\mathrm{S9788}} \ + \ 10\% \ \ \mathrm{IEC50}_{\mathrm{PSC}}, \ \ 75\% \ \ \mathrm{IEC50}_{\mathrm{S9788}} \ + \ \ 25\%$  $\mathrm{IEC50}_{\mathrm{PSC}}, \quad 50\% \quad \mathrm{IEC50}_{\mathrm{S9788}} \quad + \quad 50\% \quad \mathrm{IEC50}_{\mathrm{PSC}}, \quad 25\%$  $IEC50_{S9788} + 75\% IEC50_{PSC}, 10\% IEC50_{S9788} + 90\%$ IEC50<sub>PSC</sub>, and compared to each drug used alone. The same calculation was made from concentrations decreasing the resistance index by 90% (IEC90). All combinations were evaluated using cytotoxicity and flow cytometry assays. Fluorescence microscopy analyses were performed on slides containing cells exposed to daunorubicin for 2 h with and without modulating agents at IEC50 and IEC90, then to 50% IEC50 $_{\rm S9788}$  + 50% IEC50 $_{\rm PSC}$  and 50% IEC90<sub>S9788</sub> + 50% IEC90<sub>PSC</sub> combinations of PSC833 and \$9788.

For both flow cytometry and cytotoxicity assays, interaction analyses were carried out using multiple drug interaction analysis algorithm from Chou and Talalay (33), considering the modulating activity as end point, thus expressing the relative ability of Pgp blocker(s) to reverse daunorubicin resistance by 50% (IEC50) and 90% (IEC90). The algebraic expression of the median-effect equation is  $f_a/f_u = (C/C_m)^m$  with  $f_a$  being the fraction affected,  $f_u$ the fraction unaffected by the treatment ( $f_u = 1 - f_a$ ), Cthe concentration of drug,  $C_m$  the concentration that is required to produce a median effect (IEC50) and m the



FIG. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of reverse transcriptionpolymerase chain reaction products for MDR1-mRNA (**A** and **B**) and MRP-mRNA (**C** and **D**) expression in MCF7 (**A** and **C**) and MCF7<sup>DXR</sup> cells (**B** and **D**).

slope of the median-effect plot representing the varation of log  $(f_a/f_u)$  as a function of log (dose). This algorithm can be applied for a combination of two drugs (\$9788 and PSC833) and data analyzed through the calculation of combination indexes (CI). Nonexclusive analysis of the data was applied since both drugs should have common cellular targets (at least Pgp) and CI can be calculated for any given effect E (IEC50 or IEC90) from the equation:  $CI = C_{(S9788)} / C_{E(S9788)} + C_{(PSC833)} / C_{E(PSC833)} + C_{(S9788)} \times$  $C_{(\text{PSC833})}/C_{E(\text{S9788})} \times C_{E(\text{PSC833})}$  with C being the concentration of each drug used in the combination that produced the given effect E and  $C_E$  being the concentration of each drug that produced the effect *E* when used alone. The nature of the interaction between the two drugs was deduced from CI values. CI > 1 reveals subadditive interaction (antagonism); CI = 1 reveals additivity; CI < 1reveals supraadditive interaction (synergism).

#### Statistical Analysis

Each experiment was repeated at least three times and, for cytotoxicity assays, the results were expressed as mean values ( $\pm$  standard deviation) of a minimum of eight wells in triplicate assays. Student's *t*-test was employed to determine the statistical significance with a limit set to P < 0.05 using Statview 4.02 software (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA).

#### RESULTS

#### MDR, MRP, LRP, and ARA Expression

Both MCF7 and MCF7<sup>DXR</sup> cell lines were found negative for LRP expression (<5% labeled cells) and slightly positive for MRP expression (11  $\pm$  5% labeled cells). Pgp was not detectable in the parental cell line and was strongly expressed in MCF7<sup>DXR</sup> (92  $\pm$  7% labeled cells).

No expression of MDR1-mRNA was detectable in the sensitive parental cells (Fig. 1A). RT-PCR products gel

MERLIN ET AL.



FIG. 2. Agarose gel electrophoresis patterns of reverse transcriptionpolymerase chain reaction products for MRP6 and ARA-mRNA expression in MCF7 (**lane 1**) and MCF7<sup>DXR</sup> cells (**lane 2**). Beta-2 microglobulinmRNA extracted from MCF7 (**lane 3**) and MCF7<sup>DXR</sup> cells (**lane 4**) was used as loading control. **Lane 5** is molecular weight marker.

electrophoresis patterns (Fig. 1B) confirmed that MCF7<sup>DXR</sup> cells overexpressed MDR1-mRNA. As compared to GAPDH-mRNA expression, MDR1-mRNA RER was 0.81  $\pm$  0.04. MRP-mRNA expression was detected in both MCF7 and MCF7<sup>DXR</sup> (Fig. 1C and 1D) cells at a similar level, with RERs of 0.18  $\pm$  0.02 and 0.17  $\pm$  0.01, respectively. MRP6- and ARA-mRNA expression was detected in both MCF7 and MCF7<sup>DXR</sup> cells (Fig. 2).

#### Resistance-Modulating Activity of \$9788 and PSC833

**Cytotoxicity assays.** MCF7<sup>DXR</sup> cell line was found to be highly resistant to daunorubicin with an IC50 of 185  $\pm$  22 µmol/l versus 0.2  $\pm$  0.03 µmol/l in the parental cell line, thus corresponding to a resistance index of 985. The cytotoxicity of either S9788 or PSC833 was low with IC50 being higher than 200 µmol/l.

Figure 3 shows the dose-response curve for resistance modulation by S9788 and PSC833. Using the median effect algorithm, mean values for IEC50 were calculated for each drug and found to be 0.1  $\mu$ mol/l for S9788 and 0.2  $\mu$ mol/l for PSC833; IEC90 were, respectively, 5 and 15  $\mu$ mol/l for S9788 and PSC833. The relative standard deviation of final IEC50 and IEC90 was lower than 18%.

Intracellular daunorubicin fluorescence. Figure 4 illustrates the relationship between IDF modulation and the concentration of S9788 and PSC833. IDF in MCF-7  $^{\rm DXR}$ cells was approximately two-fold lower than in MCF-7 (MCF-7<sup>DXR</sup>/MCF-7 IDF ratio =  $0.45 \pm 0.06$ ). At concentrations leading to IEC90, a significant positive modulation in IDF was observed for both S9788 and PSC833. At concentrations leading to IEC90, a significant positive modulation in IDF was observed as IDF ratios increased 1.6  $\pm$  0.1 and  $3.1 \pm 0.4$  fold thus representing normalized modulating activities of  $0.46 \pm 0.07$  and  $1.61 \pm 0.15$ , respectively, for \$9788 and PSC833. In any case, \$9788 never restored IDF in MCF-7<sup>DXR</sup> cells to the value measured in MCF-7 cells. In contrast, at concentration leading to 90% daunorubicin resistance modulation, the effect of PSC833 shifted the IDF value in MCF-7<sup>DXR</sup> to a higher value than IDF in MCF-7



FIG. 3. Dose-response curves for S9788 (A) and PSC833 (B). MCF7<sup>DXR</sup> were incubated for 2 h with daunorubicin and the modulating agents. Concentrations inhibiting 50% of cell growth (IC50) calculated using the median effect principle and compared to that of control MCF7 and MCF7<sup>DXR</sup> cell lines exposed to daunorubicin alone. The modulating activity of S9788 and PSC833 was normalized to the sensitivity of MCF7 and MCF7<sup>DXR</sup> cells: "0" being lack of modulation, i.e., no significant variation as compared to MCF7<sup>DXR</sup>-resistant cells; "1" being complete restoral of activity, i.e., no significant variation as compared to MCF7-sensitive cells.

cells. This fact seems to illustrate that S9788 and PSC833 should act differently to modulate daunorubicin activity in MCF-7<sup>DXR</sup> cells. Figure 5 illustrates the effect of S9788 and PSC833 in MCF-7<sup>DXR</sup> cells when used at IEC90, i.e., 5 and 15  $\mu$ mol/l, respectively.

On another hand, no significant modulation (i.e., below 13%, corresponding to a four-channel shift in fluorescence intensity under logarithmic amplification) was observed for IEC50, thus tending to demonstrate that the influence of the modulating agents was probably not only acting via direct inhibition of Pgp-mediated efflux when given at low concentration.

#### DAUNORUBICIN RESISTANCE MODULATION



FIG. 4. Intracellular daunorubicin fluorescence modulation induced by S9788 and PSC833 in MCF7<sup>DXR</sup> cells incubated for 2 h simultaneously with daunorubicin and each modulating agent. Concentrations are expressed as fractions of iso-effective concentrations leading to 90% daunorubicin resistance modulation as determined from cytotoxicity assays (IEC90). Results are calculated from relative fluorescence intensity as compared to untreated control and are mean values of three independent measurements performed on at least 5000 cells using flow cytometry.

**Daunorubicin subcellular distribution.** Daunorubicin intracellular distribution pattern was found to differ in MCF-7 and MCF7<sup>DXR</sup> (Fig. 6). In MCF-7 cells (Fig. 6A), diffuse intracellular distribution pattern was observed including nuclear and cytoplasmic compartments. In MCF-7<sup>DXR</sup> cells (Fig. 6B) punctate cytoplasmic fluorescence was observed, sparing the nuclear compartment.

When MCF7 cells were incubated simultaneously with \$9788 or PSC833 and daunorubicin, no change in the intracellular distribution of the drug was observed (data not shown). In MCF7<sup>DXR</sup> cells (Fig. 7), modifications of the intracellular daunorubicin fluorescence pattern were observed as well as increases in the intracellular fluorescence intensity. Grey-level data analyses revealed that intracellular daunorubicin fluorescence intensity was increased for both compounds (data not shown). Additionally, alteration of the distribution were observed mainly with PSC833 and S9788 used at IEC90 concentrations (Fig. 7A and 7B). With \$9788, the punctate pattern of daunorubicin intracellular fluorescence of MCF7<sup>DXR</sup> cells, which was strictly intracytoplasmic, was changed to nuclear and intense cytoplasmic vesicles fluorescence (Fig. 7B), whose fluorescence intensity appeared to be increased. PSC833 nearly restored the distribution pattern of sensitive cells consisting of cytoplasmic diffuse fluorescence (Fig. 7A). Only a few fluorescent vesicles remained. When the modulating agents were used at IEC50 concentrations (Fig. 7C and 7D), only PSC833 slightly modified daunorubicin intracellular distribution pattern (Fig. 7C) with a slight decrease in the number of intracytoplasmic vesicles that did not affected the total cytoplasmic fluorescence intensity.

**MDR**, **MRP**, **LRP**, **and ARA phenotype expression**. No difference in Pgp, MRP, and LRP expression was observed when MCF7<sup>DXR</sup> cells were incubated with S9788 or



FIG. 5. Representative flow cytometry orange/red fluorescence histograms of MCF7<sup>DXR</sup> cells exposed to daunorubicin for 2 h, alone (white histograms, A, B, and C) or simultaneously with S9788 (black histogram, A) or PSC833 (black histogram, B) at iso-effective concentrations leading to 90% daunorubicin-resistance modulation as determined from cytotoxicity assays (IEC90), i.e., 5 and 15  $\mu$ mol/l, respectively. MCF7 cells exposed to daunorubicin for 2 h were used as reference (black histogram, C). Propidium iodide fluorescence was easily distinguished from daunorubicin fluorescence and allowed to identify dead, i.e., membrane altered, cells (C).

PSC833. Additionally, no significant variation in the RER of MDR1-mRNA was observed for S9788 and PSC833 in MCF7<sup>DXR</sup> cells, and no significant variation in MRP-mRNA was induced by PSC833 in both MCF7 and MCF7<sup>DXR</sup> cells. No variation of ARA-mRNA expression was observed when either MCF7 or MCF7<sup>DXR</sup> cells were incubated with S9788 or PSC833.

#### **Combinations of Modulating Agents**

**Cytotoxicity.** Drug combinations were tested by mixing complementary IEC molar fractions. Cytotoxicity results achieved with combinations of S9788 with PSC833 revealed synergistic interactions between the different modulating agents with CI values below 1 (Table 1).

When S9788 was combined with PSC833, in both IEC50 and IEC90 experiments, synergistic interactions were observed in all cases with CI < 1 ranging from 0.4 to 0.8, and

67

MERLIN ET AL.



Fig. 6. Fluorescence microscopy images of the intracellular distribution of daunorubicin in MCF7 (A) and MCF7<sup>DXR</sup> (B) cells incubated for 2 h with daunorubicin.

0.6 to 0.8, respectively for IEC50 and IEC90. The reversing activities achieved with any combination were always found to be significantly higher than the reversing activity of S9788 or PSC833 alone. Considering globally the results achieved with all combinations, the mean increase in reversing activity was 18  $\pm$  8 (P < 0.01) and 7  $\pm$  1% (P < 0.05), for IEC50 and IEC90 experiments, respectively.

**Intracellular daunorubicin fluorescence.** No significant modulation of IDF was observed for combinations elaborated from IEC50, thus confirming the results achieved with each drug tested individually. All the drug combinations calculated from cytotoxicity assays at IEC90 (Table 2) were evaluated. The results were consistent with those obtained with cytotoxicity assays for IEC90 since all combinations led a synergistic modulation of IDF, which increased to values ranging from 1.9- to 3.2-fold and corresponding normalized modulating activities ranged from 0.71 to 1.68. The CI values calculated from flow cytometry assays were all below 0.01, thus quite lower than those calculated from cytotoxicity assays, which ranged between 0.2 and 0.8.

Daunorubicin subcellular distribution. In MCF7<sup>DXR</sup> cells, exposed to IEC90 PSC833-S9788 combination (Fig. 8A), grey-level data analysis revealed an increase in intracellular daunorubicin fluorescence associated with restoral of the distribution pattern observed in sensitive MCF7 cells, i.e., distribution in both nuclear and cytoplasmic compartment. This effect was not observed with either PSC833 or S9788 alone at IEC90 concentration (Fig. 7A and 7B). The results achieved with IEC90 combination thus confirmed those achieved with cytotoxicity assays and flow cytometry analyses. Contrasting with IEC90 drug combination data, IEC50 drug combination (Fig. 8B) led to a low modulation of intracellular daunorubicin fluorescence intensity but appeared to positively modulate daunorubicin sequestration, to a higher extent than with either PSC833 or S9788 alone at IEC50 concentration (Fig.

7C and 7D), thus confirming the synergistic interaction found with cytotoxicity assays.

MDR, MRP, and ARA phenotype expression. Drug combinations were evaluated at IEC90 as 50%–50% mixture, i.e., 2.5  $\mu$ mol/l S9788 + 7.5  $\mu$ mol/l PSC833. No significant variation in MDR1-mRNA, MRP-mRNA, and ARA-mRNA was observed even for the combinations producing synergistic modulation of daunorubicin resistance or intracellular daunorubicin fluorescence.

#### DISCUSSION

Multidrug resistance of cancer cells to anthracyclines has been largely studied and its multifactorial aspect is now well established and many resistance mechanisms have been described. Resistance to anthracyclines can result from the overexpression of transport proteins such as Pgp (1) MRP (4), LRP (5), or ARA (6).

In the experimental model used in the present study, doxorubicin-selected MCF7<sup>DXR</sup> cell line, immunologic analyses revealed the overexpression of Pgp but neither MRP and ARA, nor LRP. Furthermore, independent of MRP, LRP, and ARA expression, we found that intracellular drug sequestration was also involved in the resistance of MCF7<sup>DXR</sup> cell line (19). Recently, using fluorescence microscopy colocalization image analysis, we reported that organelles involved in daunorubicin intracellular sequestration in MCF7<sup>DXR</sup> cell line were Golgi vesicles (18). In other models, biophysical alteration of the plasma membrane (23,34) was reported to be implicated in the multidrug resistance phenotype. Therefore, it appeared interesting to evaluate associations of Pgp inhibitors that could act additionally on different subcellular mechanisms. Bennis et al. (35) reported that combinations of verapamil and quinine could act synergistically on MDR; verapamil acting mostly on Pgp-mediated drug efflux and quinine acting additionally on subcellular distribution of the drugs. Hwang et al. (23) reported similar results in combining verapamil with Cremophor EL or PSC833,

#### DAUNORUBICIN RESISTANCE MODULATION



FIG. 7. Fluorescence microscopy images of the intracellular distribution of daunorubicin in MCF7<sup>DXR</sup> cells incubated for 2 h with daunorubicin simultaneously with PSC833 or S9788 at iso-effective concentrations leading to 90% and 50% daunorubicin resistance modulation as determined from cytotoxicity assays (IEC90 and IEC50). IEC90 were 15 and 5  $\mu$ mol/l for PSC833 (A) and S9788 (B), respectively. IEC50 were 0.2 and 0.1  $\mu$ mol/l for PSC833 (C) and S9788 (D), respectively.

which were demonstrated to act on the plasma membrane biophysical status. On another hand, MRP modulators such as probenecid were found to restore alteration of the subcellular distribution of anthracyclines in MRP-overexpressing cell lines but not in Pgp-overexpressing cell lines (36). In the present study, probenecid was unlikely to be active in MCF7<sup>DXR</sup> cell line, which overexpress Pgp but not MRP and, therefore, was not evaluated.

We already reported that \$9788 (19) was able to modulate the subcellular distribution of daunorubicin and thus began to evaluate \$9788 in combination with other Pgp inhibitors exhibiting a different additional mechanism of action. In addition, synergistic interaction between verapamil and \$9788 were observed (27) that could eventually be explained by the down regulation of MDR1 gene expression induced by verapamil.

Cyclosporine derivatives are well known to be very potent Pgp inhibitors. Additionally, PSC833 was found to modify the physical status of the cell membrane (23). On this basis, combinations of \$9788 with cyclosporine derivatives were evaluated. As already pointed out by Hwang et al. (23), this approach is justified because MDR-modulating agents generate toxicity when given in vivo at high doses. Therefore, any attempt to decrease the doses while keeping constant the modulating activity is interesting. In the present study, two activity levels were aimed at with median (50%) and near-complete (90%) modulating activity. In the first case, the concentration ranges used, 0.01-0.1 and 0.02-0.2 µmol/l for \$9788 and PSC833, respectively, would be easily achievable in vivo or in a clinical setting for either of the compounds tested. In the second case, all concentrations were quite suprapharmacologic and were only justified as some way of evaluating the activity of the modulators in a clinically irrelevant, highly resistant cell model expressing a high amount of Pgp. The results obtained revealed that, at high concentrations, all compounds induced increases in intracellular daunorubicin fluorescence that correlated with the reversion of

#### MERLIN ET AL.

	Interaction Analysis of the Cytotoxicity Assays								
A	\$9788 (µmol/l)	PSC833 (µmol/l)	Modulating activity	Combination index	Interaction				
	0.010 0.025 0.050 0.075 0.090	0.18 0.15 0.10 0.05 0.02	0.62 0.53 0.54 0.62 0.64	$\begin{array}{c} 0.48 \pm 0.02 \\ 0.85 \pm 0.09 \\ 0.88 \pm 0.11 \\ 0.52 \pm 0.03 \\ 0.45 \pm 0.01 \end{array}$	Synergistic Synergistic Synergistic Synergistic Synergistic				
В	\$9788 (μmol/l)	PSC833 (µmol/l)	Modulating activity	Combination index	Interaction				
	0.50 1.25 2.50 3.75 4.50	13.50 11.25 7.50 3.75 1.50	0.98 0.97 0.97 0.96 0.94	$\begin{array}{c} 0.60 \pm 0.01 \\ 0.86 \pm 0.02 \\ 0.64 \pm 0.03 \\ 0.64 \pm 0.06 \\ 0.85 \pm 0.09 \end{array}$	Synergistic Synergistic Synergistic Synergistic Synergistic				

Table 1							
Interaction	Analysis	of the	Cytotoxicity	Assays <sup>a</sup>			

<sup>a</sup>The end point was the resistance-modulating activity with reference to the sensitive cell line: 0 is lack of modulation, 1 is full recovery of the cell sensitivity to daunorubicin. Chou and Talalay's algorithm for multiple drug analysis based on the calculation of combination index was used. Drug combinations were calculated from the respective IEC50 (**A**) and IEC90 (**B**) values of S9788 (0.1 and 5  $\mu$ mol/I) and PSC833 (0.2 and 15  $\mu$ mol/I). Interaction is classified as synergistic (combination index < 1), additive (combination index = 1), or antagonistic (combination index > 1).

 Table 2

 Interaction Analysis of the Flow Cytometry Assays<sup>a</sup>

S9788 (μmol/l)	PSC833 (µmol/l)	Modulating activity	Combination index	Interaction
0.50	13.50	$1.68 \pm 0.12$	< 0.01	Synergistic
1.25	11.25	$1.47\pm0.10$	< 0.01	Synergistic
2.50	7.50	$1.34 \pm 0.11$	< 0.01	Synergistic
3.75	3.75	$0.90 \pm 0.09$	< 0.01	Synergistic
4.50	1.50	$0.71\pm0.06$	< 0.01	Synergistic

<sup>a</sup>The end point was the resistance-modulating activity with reference to the sensitive cell line: 0 is lack of modulation, 1 is full recovery of the intracellular daunorubicin fluorescence. Chou and Talalay's algorithm for multiple drug analysis based on the calculation of combination index was used. Drug combinations were calculated from the respective IEC90 value of each modulating agent as determined from cytotoxicity assays. Interaction is classified as synergistic (combination index < 1), additive (combination index = 1), or antagonistic (combination index > 1).

daunorubicin resistance. At low concentrations, no significant effect of S9788 was noticed on IDF but the cytotoxicity was significantly restored (50% modulating activity). This suggests some influence on the subcellular distribution of the drugs occuring at lower concentrations than their Pgp-blocking activity and probably leading to an increase in drug availability for their nuclear targets. This point is consistent with our previous findings with S9788 (19) showing that it induced an increase in the nuclear distribution of <sup>3</sup>H-daunorubicin while cyclosporine A had no effect.

PSC833 and S9788 seemed to differ in the implication of subcellular targets. In resistant cells incubated with daunorubicin and S9788, a binary pattern of daunorubicin distribution was observed with intense nuclear fluorescence and perinuclear fluorescent vesicles, that we re-

cently identified as Golgi vesicles (18) as already hypothetized (37). The present results further suggest that S9788 could act in one hand by blocking Pgp activity and in another hand by partially inhibiting the sequestration of daunorubicin in Golgi vesicles. PSC833 was found to restore the "sensitive" fluorescence distribution pattern observed in sensitive cells, thus confirming that PSC833 could strongly modulate daunorubicin sequestration in Golgi vesicles.

The results achieved further suggest a strong relationship between daunorubicin intracellular distribution pattern and cytotoxicity. In MCF7<sup>DXR</sup>, IEC90 combinations allowed restoration of daunorubicin intracellular concentration, as well as diffuse cytoplasmic and nuclear distribution as observed in MCF7 cells, while IEC50 combinations did not appear to restore daunorubicin intracellular concentration but did partially modulate daunorubicin intracellular sequestration.

As already suggested (23), at low concentration, the cyclosporine derivatives probably act mostly on the membrane physical status, inducing a moderate effect on intracellular drug concentration. At higher concentration, their Pgp-blocking activity is triggerred on and influence the cell sensitivity by increasing the intracellular concentration of daunorubicin. Recent studies demonstrated the prevalent role in cell-death induction of ceramide generation, which was found to be mediated by daunorubicin (24), as well as correlation between daunorubicin cytoplasmic sequestration modulation and inhibition of ceramide generation (25). In this way, PSC833 appeared to not only potently block P-glycoprotein but also restore daunorubicin intracellular distribution through daunorubicin-induced ceramide synthesis (25,26). These different modes of action between PSC833 and S9788, related to the concentration, appeared clearly when the increase in



FIG. 8. Fluorescence microscopy images of the intracellular distribution of daunorubicin in MCF7<sup>DXR</sup> cells incubated for 2 h with daunorubicin simultaneously with PSC833-S9788 combinations. Mixtures were based on 50:50 molar ratios of iso-effective concentrations leading to 90% and 50% daunorubicin resistance modulation as determined from cytotoxicity assays (IEC90 and IEC50). IEC90 combination (A) consisted in 7.5 and 2.5 µmol/l for PSC833 and S9788, respectively. IEC50 combination (B) consisted in 0.1 and 0.05 µmol/l for PSC833 and S9788, respectively.

IDF was found to be more strongly related to PSC833 concentration.

Another way of modulating MDR was evidenced because some compounds, such as verapamil and PSC833 (28), were found to down-regulate the expression of MDR1 gene. To our knowledge, no information was reported on the influence of S9788 on MDR1 or MRP gene expression. In the present article, PSC833 did not significantly modify the expression of MDR1-mRNA in MCF7<sup>DXR</sup> cell line. No modification of the expression of MRP- and ARA-mRNA was found. S9788 did not influence the expression of any of these two genes when given either individually or in combination with PSC833. Based on these results, the synergistic effect observed with the combinations cannot be explained by any influence on gene expression regulation as opposed to results achieved with verapamil.

In conclusion, the results achieved in the present study show that combinations of Pgp blockers exhibiting different alternative modes of action, including modulation of drug sequestration in Golgi vesicles, could yield a synergistic effect on the reversion of daunorubicin cellular resistance. Such results are particularly interesting in view of the clinical development of Pgp blockers as resistance modulators because combinations could offer alternative ways to decrease the occurrence of dose-limiting side effects without altering the efficacy of the resistance modulation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to H. Gautier for fluorescence microscopy images processing and to Dr. R. A. Davey (Bill Walsch Cancer Research Laboratories, Royal North Shore Hospital, St Leonards, Australia) for helpful discussion about ARA analysis.

#### LITERATURE CITED

- Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Annu Rev Biochem 1989;58:137-171.
   Abbaszadegan MR, Cress AE, Futscher BW, Bellamy WT, Dalton WS.
- Abpaszadegan MR, Cress AE, Futscher BW, Behamy WT, Daton WS. Evidence for a cytoplasmic P-glycoprotein location associated with increased multidrug resistance and resistance to chemosensitizers. Cancer Res 1996;56:5435-5442.
- Labroille G, Belloc F, Bilhou-Nabera C, Bonnefille S, Bascans E, Boisseau MR, Bernard P, Lacombe F. Cytometric study of intracellular P-gp expression and reversal of drug resistance. Cytometry 1998;32:86– 94.
- Flens MJ, Izquierdo MA, Scheffer GL, Fritz JM, Meijer CJLM, Scheper RJ, Zaman GJR. Immunochemical detection of the multidrug resistance associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. Cancer Res 1994;54:4557–4563.
- Scheper RJ, Broxterman JH, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, Van Heijningen THM, Van Kalken CK, Slovak ML, De Vries EGE, Van der Valk P, Meijer C, Pinedo HM. Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance. Cancer Res 1993;53:1475-1478.
- 6. O'Neill GM, Peters GB, Harvie RM, MacKenzie HB, Hennes S, Davey RA. Amplification and expression of the ABC transporters ARA and MRP in a series of multidrug-resistant leukaemia cell sublines. Br J Cancer 1998;77:2076–2080.
- Huet S, Chapey C, Robert J: Reversal of multidrug resistance by a new lipophilic cationic molecule, S9788. Comparison with 11 other MDRmodulating agents in a model of doxorubicin-resistant rat glioblastoma cells. Eur J Cancer 1993;29A:1375-1383.
- Merlin JL, Guerci A, Marchal S, Missoum N, Ramacci C, Humbert JC, Tsuruo T, Guerci O. Comparative evaluation of 59788, verapamil and cyclosporin A in K562 human leukemia cell lines and in P-glycoprotein expressing samples from patients with hematological malignancies. Blood 1994;84:262–269.
- Pierre A, Dunn TA, Kraus-Berthier L, Leonce S, Saint-Dizier D, Regnier G, Dhainaut A, Berlion M, Bizzari JP, Atassi G. In vitro and in vivo circumvention of multidrug resistance by Servier 9788, a novel triazinoaminopiperidine derivative. Invest New Drugs 1992;10:137–148.
- Boesch D, Gaveriaux C, Jachez B, Pourtier-Manzanedo A, Bollinger P, Loor F. In vivo circumvention of P-glycoprotein mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ-PSC 833. Cancer Res 1991;51: 4226-4233.

#### MERLIN ET AL.

- Jiang XR, Kelsey SM, Wu YL, Newland AC. Circumvention of Pglycoprotein-mediated drug resistance in human leukaemic cells by non-immunosuppressive cyclosporin D analogue, SDZ PSC 833. Br J Haematol 1995;90:375–383.
- Keller RP, Altermatt HJ, Nooter K, Poschmann G, Laissue JA, Bollinger P, Hiestand C. SDZ PSC833, a non immunosuppressive cyclosporine: its potency in overcoming P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of murine leukemia. Int J Cancer 1992;50:593–597.
- Merlin JL, Guerci AP, Marchal S, Bour C, Colosetti P, Kataki A, Guerci O. Influence of SDZ-PSC833 on daunorubicin intracellular accumulation in bone marrow specimens from patients with acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 1998;103:480 - 487.
- 14. Cobb PW, Burris HA, Cook G, Weiss G, Fields S, Pearce T, Von Hoff DD. Phase I trial of PSC 833 and doxorubicin, vincristine, cyclophosphamide, and prednisone (DVCP) in patients with refractory non-Hodgkin's lymphoma. Anti Cancer Drugs 1994;5:55.
- Sonneveld P, Marie JP, Vekhof A, Schoester M, Faussat AM, Van Kapel J, Groenwegen A, Charnick S, Zittoun R, Löwenberg B. Reversal of multidrug resistance by SDZ PSC 833, combined with VAD (vincristine, doxorubicin, dexamethasone) in refractory multiple myeloma. A phase I study. Leukaemia 1996;10:1741-1750.
- 16. Terret C, Le Cesne A, Lagarde A, Di Palma M, Goncalves E, N'Dom P, Yataghene Y, Funck-Brentano C, N'Guyen JP, Marino JP, Besse B, Armand JP, Le Chevalier T, Belpomme D, Misset JL, D'Agay L, Berger E, Sarkany M, Giroux B. S9788 a multidrug resistance (MDR) reversing agent: French phase I studies with a 6 hour continuous infusion schedule in combination with chemotherapy in patients with refractory cancer. Proc Amer Assoc Cancer Res 1996;37:165.
- Gervasoni JE, Fields SZ, Krishna S, Baker MA, Rosado M, Thuraisami K, Hindenburg AA, Taub RN. Subcellular distribution of daunorubicin in P-glycoprotein-positive and negative-drug resistant cell lines using laser-assisted confocal microscopy. Cancer Res 1991;51:4955-4963.
   Bour C, Gramain MP, Merlin JL, Marchal S, Guillemin F. Determina-
- Bour C, Gramain MP, Merlin JL, Marchal S, Guillemin F. Determination of intracellular organelles implicated in daunorubicin cytoplasmic sequestration in multidrug resistant MCF-7 cells using fluorescence microscopy image analysis. Cytometry 2000;39:16–25.
- Merlin JL, Marchal S, Ramacci C, Dieterlen A, Schultz G, Lucas C, Poullain MG, Berlion M. Influence of \$9788, a new modulator of multidrug resistance, on the cellular accumulation and subcellular distribution of daunorubicin in P-glycoprotein-expressing MCF7 human breast adenocarcinoma cells. Cytometry 1995;20:315-323.
- Sehested M, Skoosgaard T, Van Deurs B, Winther-Nielsen H. Increased plasma membrane traffic in daunorubicin resistant P388 leukemia cells. Effect of daunorubicin and verapamil. Br J Cancer 1987;56:747-751.
- Oum Hamed Z, Berlion M, Millot-Broglio C, Dufer J, Joly P, Bizzari JP, Desplaces A. Quantitative cytological study of the activity of a new resistance modulator, S9788, on human leukemic cells using multiparametric image analysis. Bull Cancer 1994;81:203–211.
- Ross DD, Wooten PJ, Tong Y, Cornblatt B, Levy C, Sridara R, Lee J, Schiffer CA. Synergistic reversal of multidrug-resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by cyclosporin A and cremophor EL. Blood 1994;83:1337-1347.
- Hwang M, Ahn CH, Pine PS, Yin JJ, Hrycyna CA, Licht T, Aszalos A. Effect of combinations of suboptimal concentrations of P-glycoprotein blockers on the proliferation of MDR gene expressing cells. Int J Cancer 1996;65:389-397.

- 24. Jaffrezou JP, Levade T, Bettaieb A, Andrieu N, Bezombes C, Maestre N, Vermeersch S, Rousse A, Laurent G. Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. EMBO J 1996;15:2417-2424.
- Come MG, Bettaieb A, Skladanowski A, Larssen AK, Laurent G. Alteration of the daunorubicin-triggered sphingomyelin-ceramide pathway and apoptosis in MDR cells: influence of drug transport abnormalities. Int J Cancer 1999;81:580–587.
- 26. Cabot MC, Giuliano AE, Han TY, Liu YY. SDZ-PSC833, the cyclosporine A analogue and multidrug resistance modulator, activates ceramide synthesis and increases vinblastine sensitivity in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells. Cancer Res 1999;59:880-885.
- Bour C, Gramain MP, Merlin JL. Modulation of daunorubicin subcellular distribution in multidrug resistant MCF-7 cells by SDZ-PSC 833. Proc Amer Assoc Cancer Res 1997;38:553.
- Beketic-Oreskovic L, Duran GE, Chen G, Dumontet C, Sikic BI. Decreased mutation rates for cellular resistance to doxorubicin and suppression of mdr1 gene activation by the cyclosporin PSC833. J Natl Cancer Inst 1995;87:1593–1602.
- Cowan KH, Batist G, Tupule A, Sinha BK, Myers CE. Similar biochemical changes in human breast cancer cells and in carcinogen-induced resistance to xenobiotics. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:9328-9332.
- Noonan K, Beck C, Holtzmayer T, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, Von Hoff DD, Roninson IB. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:7160-7164.
- Bordow SB, Haber M, Madafiglio J, Cheung B, Marshall GM, Norris MD. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. Cancer Res 1994;54:5036– 5040.
- 32. Merlin JL, Marchal S, Ramacci C, Notter D, Vigneron C. Antiproliferative activity of thermosensitive liposome-encapsulated doxorubicin combined with 43°C hyperthermia in sensitive and multidrug resistant MCF-7 cells. Eur J Cancer 1993;29A:2264–2268.
- 33. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzym Regul 1984;22:27-55.
- 34. Callaghan R, Stafford A, Epand RM. Increased accumulation of drugs in a multidrug resistant cell line by alteration of membrane potential properties. Biochem Biophys Acta 1993;1175:277-282.
- Bennis S, Ichas F, Robert J. Differential effects of verapamil and quinine on the reversal of doxorubicin resistance in a human leukemia cell line. Int J Cancer 1995;62:283–290.
- 36. Gollapudi S, Kim CH, Tran BN, Sangha S, Gupta S. Probenecid reverses resistance in multidrug resistance-associated protein-overex-pressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein over-expressing HL60/TAX and P388/ADR cells. Cancer Chemother Pharmacol 1997;40:150–158.
- Molinari A, Cianfriglia M, Meschini S, Calcabrini A, Arancia G. Pglycoprotein in the golgi apparatus of multidrug-resistant cells. Int J Cancer 1994;59:789-795.

72

# 7. Evaluation de la modulation de la résistance à la daunorubicine sur prélèvements leucémiques

Parmi les différents critères biologiques retenus pour mesurer le phénotype MDR en clinique, on retrouve en général la diminution de l'accumulation d'anthracycline, le niveau d'expression du gène mdr1, mrp1 et lrp et/ou de leur protéine respective. Afin de circonvenir la résistance aux anthracyclines, différents composés ont été évalués afin de moduler la résistance aux anthracyclines par inhibition de la P-gp.

# 7.1. Modulation de l'accumulation de la daunorubicine

L'ensemble des méthodes ainsi que les résultats obtenus dans cette problématique ont fait l'objet d'une publication (Merlin et al., 1998) qui est intégrée en Annexes.

BUT: une étude comparative entre le PSC-833 et la cyclosporine A (CSA) a été effectuée sur 45 prélèvements de moelle osseuse de patients avec une *LAM* au diagnostic. Les critères évalués étaient l'expression de la P-gp et la fluorescence intracellulaire de la daunorubicine (DNR). Les résultats pré-cliniques obtenus pour un modèle cellulaire, la lignée cellulaire leucémique *multidrug resistant* (MDR) K562, ont permis d'établir les concentrations équitoxiques de restauration complète d'accumulation de la DNR de 5 et 10  $\mu$ M, respectivement pour le PSC-833 et la CSA.

RESULTATS-DISCUSSION : le PSC-833 s'est révélé un agent modulateur plus efficace à 5  $\mu$ M que la CSA à 10  $\mu$ M aussi bien par l'augmentation de la fluorescence intracellulaire de la DNR induit, que par le nombre de prélèvements de patients pour lesquelles la fluorescence de la DNR était accrue. En outre le PSC-833 est également actif en terme de *modulation de l'accumulation intracellulaire de la DNR* sur des échantillons présentant un faible contenu en DNR exprimant ou non la P-gp.

*CONCLUSIONS* : ces travaux ont mis en évidence la possibilité de moduler l'accumulation intracellulaire de la DNR dans le contexte clinique par le PSC-833. Cette expérience clinique commune mise à profit, a permis ainsi d'aller plus en avant dans cette problématique, et considérer l'implication du phénomène de séquestration de la DNR dans le contexte clinique.

7.2. Modulation de la distribution intracellulaire de la daunorubicine

Si les critères d'accumulation (et/ou d'efflux) des anthracyclines, associés ou non à leur modulation ont fait leurs preuves en tant que critères prédictifs du phénotype MDR dans les leucémies, les indications concernant l'impact de la distribution intracellulaire restent rares.

Une étude préliminaire par microscopie de fluorescence a été réalisée afin de déterminer si le phénomène de *séquestration* de la daunorubicine (DNR) existe en *clinique*, puis d'évaluer *l'effet du PSC-833 sur sa distribution*.

L'étude est effectuée sur des prélèvements leucémiques, principalement au diagnostic, de patients adultes (LAM) et d'enfants (LAL). En outre, différents paramètres sont également inclus pour l'analyse des prélèvements comme les caractéristiques cliniques (âge, réponse clinique, caractère cytopathologique) et les critères biologiques.

# 7.2.1. Caractérisation des prélèvements

Dans cette étude la caractérisation clinique comprend l'âge du patient, la nature cytopathologique du prélèvement, le suivi et l'indication thérapeutique (*Tableau 13*). Les critères biologiques comprennent la cytotoxicité de la DNR ainsi que différents ratios d'expression relative de gènes d'intérêt (mdr1, mrp1, et topoisomérases II) (*Tableau 13*). L'effectif comportant des données complètes étant réduit, il n'est pas possible de réaliser une étude de comparaison afin de déterminer le caractère prédictif des différents facteurs évalués. Toutefois, il est possible d'analyser les critères biologiques en comparant les résultats entre les différents prélèvements.

Concernant l'expression des gènes des *prélèvements d'enfants (LAL)*, le ratio moyen d'expression relative indique une faible expression moyenne du gène mdr1 ( $0,12 \pm 0,08$ ). Le gène mrp1 est exprimé de façon constitutive ( $1,05 \pm 0,19$ ). Quelle que soit la topoisomérase II évaluée ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), son expression moyenne reste faible (respectivement  $0,11 \pm 0,05$  ou  $0,04 \pm 0,03$ ). Les IC<sub>50</sub> déterminées principalement pour les enfants font état d'une variabilité importante de la sensibilité à la daunorubicine de  $0,02 \ge 0,38 \mu$ M.

Pour les prélèvements d'adultes (LAM), les moyennes d'expression des gènes sont comparables à celles obtenues pour les enfants pour mrp1 (respectivement  $1,02 \pm 0,07$  et  $1,05 \pm 0,19$ ), topoII $\alpha$  (respectivement  $0,14 \pm 0,07$  et  $0,11 \pm 0,05$ ) et topoII $\beta$  (respectivement  $0,03 \pm 0,01$  et  $0,04 \pm 0,03$ ), alors qu'elle semble supérieure pour le gène mdr1 (respectivement  $0,17 \pm 0,09$ et  $0,12 \pm 0,08$ ).

N°	Age	P <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>	ľ	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	mdr1 <sup>e</sup>	mrp1 <sup>e</sup>	topoIIa °	topoIIβ <sup>e</sup>
	(ans)				(µM)				
1	14	Diagn.	Rec.	LAL	0,38	0,08 ± 0,02	1,02 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01
2	11	Diagn.	Rem.	LAL	0,38	0,09 ± 0,01	$0,74 \pm 0,02$	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,02
3	12	Diagn.	Rem.	LAL	0,06	0,08 ± 0,01	<b>1,13</b> ± 0,06	$0,11 \pm 0,04$	0,04 ± 0,01
4	14	Diagn.	Rec.	LAL	0,12	0,12 ± 0,03	1,15 ± 0,07	$0,17 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,00$
5	3	Diagn.	Rec.	LAL	0,02	<b>0,27</b> ± 0,05	0, <b>96</b> ± 0,09	$0,12 \pm 0.03$	$0,02 \pm 0,00$
6	3	Diagn.	Rem.	LAL	0	0,07 ± 0,01	<b>1,29</b> ± 0,04	$0,08 \pm 0.02$	0,06 ± 0,01
7	nd	Diagn.	Rem.	LAL	0,08	nd	nd	nd	nd
8	11	Rechute	+	LAL	¢	ф	ф.	ф	φ
9	42	Diagn.	nd	LAM	nd	0,07 ± 0,01	1,12 ± 0,08	$0,07 \pm 0,02$	0,06 ± 0,01
10	nd	Diagn.	nd	LAM	nd	0,18 ± 0,06	0,99 ± 0,02	$0,19\pm0,07$	0,05 ± 0,01
11	15	Diagn.	Rem.	LAM	0,56	<b>0,28</b> ± 0,02	$1,03 \pm 0.03$	0,21 ± 0,05	0,04 ± 0,00
12	nd	Diagn.	nd	LAM	nd	<b>0,14</b> ± 0,01	<b>1,11</b> ± 0,10	$0,05 \pm 0,01$	0,03 ± 0,01

Tableau 13 : Critères de référence d'analyse des prélèvements de leucémies de LAL d'enfants (1 à 8) et de LAM d'adultes (9 à 12).

nd : Données non déterminées

 $\phi$  : Critère non mesuré par manque de cellules

<sup>a</sup> (P), Nature cytopathologique du prélèvement : Diagn. (diagnostic) ou Rechute. <sup>b</sup> (S), Patient dont le suivi thérapeutique est connu : Rec. (Rechute), Rém. (Rémission), † (décédé). <sup>c</sup> (I), Indication thérapeutique : leucémie aiguë lymphocytaire (LAL) ou leucémie aiguë myéloïde (LAM). <sup>d</sup> IC<sub>50</sub> obtenues pour la DNR par le test colorimétrique MTT, réalisé pour un contact de 72 h continu avec la DNR. <sup>e</sup> ratio d'expression entre le gène d'intérêt et le gène de référence ( $\beta$ 2-microglobuline); contrôles réalisés pour le couple MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup>.

# 7.2.2. Distribution intracellulaire de la daunorubicine

Différentes expérimentations de microscopie de fluorescence ont été réalisées pour évaluer la distribution de la fluorescence intracellulaire de la DNR des prélèvements disponibles. Elles ont consisté dans un premier temps à caractériser morphologiquement différents organites intracellulaires. Puis, les prélèvements au diagnostic ont permis de modéliser la répartition des cellules en fonction de leur contenu en vésicules cytoplasmiques. Cette méthode a été appliquée afin de comparer d'une part le contenu "vésiculaire" des prélèvements au diagnostic et du prélèvement en rechute, et d'autre part entre les prélèvements incubés avec la DNR seule et co-incubés avec le PSC-833.

# 7.2.2.1. Evaluation qualitative et quantitative de la distribution de la DNR dans le compartiment cytoplasmique

Caractérisation morphologique.

Parmi les différents organites intracellulaires, l'appareil de Golgi, les lysosomes et le réticulum endoplasmiques (RE) ont été retenus pour caractériser le compartiment cytoplasmique alors que les membranes nucléaires et les nucléoles identifient le compartiment nucléaire.

La *Figure 21* illustre les résultats obtenus pour un prélèvement leucémique d'adulte, qui sont similaires à ceux obtenus pour les prélèvements leucémiques d'enfants. Les images en fond clair (*Figure 21b, d, f, h*) permettent d'évaluer l'état de viabilité cellulaire, ainsi que de contrôler la localisation du marquage effectué.



Figure 21 : Caractérisation morphologique d'un échantillon issu d'un prélèvement de LAM d'adulte par marquage des organites intracellulaires. L'appareil de Golgi (Golgi) : marqué par le NBD-C<sub>6</sub>-céramide a) ; image en fond clair correspondante b). Le réticulum endoplasmique (RE) : marqué par le  $DiOC_6$  c) ; image en fond clair correspondante d). Le noyau et les lysosomes : marqués par l'acridine-orange. Lysosomes e) ; image en fond clair correspondante f). Noyau g) ; image en fond clair correspondante h).

Le marquage de l'appareil de Golgi montre la compacité du compartiment membranaire et vésiculaire de la région *cis* (*Figure 21a*), contrairement au réticulum endoplasmique (RE) dont le complexe constitué de membranes et de vésicules se disperse dans la région périnucléaire (*Figure 21c*). Les lysosomes apparaissent sous formes de petites vésicules (< 1  $\mu$ m) et se

distribuent à travers le cytoplasme (*Figure 21e*). Le compartiment nucléaire occupe un volume prépondérant du volume cellulaire (*Figure 21g*).

# Distribution de la fluorescence intracellulaire de la DNR.

Après incubation avec la DNR à 2  $\mu$ M pendant 2 h, les cellules sont observées par microscopie de fluorescence et les images sont obtenues selon des conditions d'acquisition rigoureusement contrôlées.

Quelle que soit l'origine du prélèvement enfant (LAL) ou adulte (LAM), la DNR se distribue à travers le compartiment nucléaire et cytoplasmique des cellules (*Figure 22a et b*). Le compartiment nucléaire est marqué par la fluorescence de la DNR aussi bien au niveau de ses membranes, que de sa chromatine et son nucléole. Le compartiment cytoplasmique est marqué de façon diffuse par la fluorescence de la DNR mais inclut également des vésicules proches du noyau.



Figure 22 : Illustration de la distribution intracellulaire de la fluorescence de la DNR pour un prélèvement a) d'enfant (LAL) et b) d'adulte (LAM) après 2 h d'incubation à 2  $\mu$ M.

# Evaluation quantitative des vésicules cytoplasmiques de DNR.

La procédure d'analyse est définie en fonction des résultats exclusivement obtenus pour les prélèvements au diagnostic, incubés avec la DNR seule à 2  $\mu$ M pendant 2 h Pour chaque prélèvements trois comptages sont effectués. Le comptage consiste à dénombrer les vésicules cytoplasmiques marquées par la fluorescence de la DNR et ce pour différents plans axiaux, afin de couvrir l'ensemble du volume cellulaire. Le nombre de vésicules varie de 0 à 22 par cellule pour l'ensemble des prélèvements analysés. Les prélèvements au diagnostic ont un schéma de distribution comparable (*Figure 23*).



Nombre de vésicules par cellule

Figure 23 : Pourcentage de cellules en fonction du nombre de vésicules par cellule pour chaque prélèvement au diagnostic.

L'ensemble des prélèvements au diagnostic semblent comprendre une population prépondérante sans vésicules cytoplasmiques marquées par la fluorescence de la DNR, ainsi que différentes sous populations caractérisées par un taux plus important de vésicules cytoplasmiques.

Afin de faciliter l'analyse des données, des catégories sont constituées. Elles sont caractérisées par le nombre de vésicules marquées par la fluorescence de la DNR par cellule. Les catégories de nombre de vésicules par cellules retenues sont les suivantes : 0 vésicule, 1 à 5 vésicules, 6 à 10 vésicules, et plus de 10 vésicules par cellule. La répartition des pourcentages reflète fidèlement la distribution des courbes originales en conservant le caractère hétérogène des populations cellulaires (*Tableau 14*). L'exploitation des données moyennes confirme l'existence d'une population cellulaire prépondérante (58 et 48%) sans vésicule cytoplasmique (*Tableau 14*). Parmi les sous populations, les cellules à faible densité de vésicules sont majoritaires (40 et 35%), alors que les populations à moyenne et forte densité de vésicules sont minoritaires (*Tableau 14*).

Pour les prélèvements d'adultes, un décalage apparaît vers des populations à forte densité de vésicules par cellule. Cependant quelle que soit l'origine du prélèvement, la variabilité de la distribution en fonction du prélèvement est importante (*Tableau 14*).

Nombre de vésicules	% de cellules					
par cellule	E	Enfants	Adultes			
-	(	(n = 7)	(1	n = 4)		
0	58 <sup>a</sup>	[30-86] <sup>b</sup>	48 °	[37-82] <sup>d</sup>		
1-5	40	[65-14]	35	[47-12]		
6-10	2	[5-0]	14	[13-5]		
>10	0	[0-0]	3	[3-1]		

 Tableau 14 : Comparaison des répartitions des pourcentage cellulaires en fonction du nombre de vésicules

 marquées par la fluorescence de la DNR pour les prélèvements au diagnostic.

<sup>a</sup> Pourcentages moyens pour les enfants au diagnostic. <sup>b</sup> Valeurs extrêmes. <sup>c</sup> Pourcentages moyens pour les adultes au diagnostic. <sup>d</sup> Valeurs extrêmes

# 7.2.2.2. Effet du PSC-833 sur la distribution cytoplasmique de la DNR

Afin d'évaluer l'effet du PSC-833 sur le taux de vésicules marquées par la DNR, les cellules sont co-incubées en présence de DNR à 2  $\mu$ M avec le PSC-833 à 5  $\mu$ M. Puis les cellules sont observées par microscopie à épifluorescence. Les images sont obtenues selon des conditions d'acquisitions identiques à celles utilisées pour les échantillons incubés avec la DNR seule.

La comparaison entre les prélèvements d'enfants au diagnostic et le prélèvement d'enfant issu d'une rechute suggère l'existence de l'altération de la distribution intracellulaire de la DNR. Cette altération se traduit par un décalage du pourcentage de cellules, par rapport à la distribution moyenne des prélèvements au diagnostic, des catégories sans vésicule cytoplasmique (6% vs 58%) vers des catégories à faible (64% vs 40%), moyen (27% vs 2%), et fort taux de vésicules (3% vs 0%). Ce phénomène peut être comparable au phénomène de séquestration cytoplasmique de la DNR rencontré *in vitro*.

La distribution de l'échantillon en rechute implique que certains prélèvements au diagnostic, puissent présenter des altérations de distribution intracellulaire de la DNR. Parmi les prélèvements au diagnostic, 4 prélèvements d'enfants (LAL) sur 7 (N° 1, 3, 4 et 7) et 3 prélèvements d'adultes (LAM) sur 4 (N° 9, 11 et 12) ont un pourcentage de cellules sans vésicule strictement inférieur à la moyenne obtenue pour les prélèvements au diagnostic. Pour les prélèvements d'enfants, 3 prélèvements sur 4 ont été évalués au niveau de l'expression relative des gènes mdr1 et mrp1 (*Tableau 13*). Les valeurs obtenues, pour les enfants et les adultes présentant ce phénotype, indiquent que 2 échantillons sur 3 présentent pour le gène mrp1 un taux également au-dessus de la moyenne.

Le PSC-833 augmente le pourcentage cellulaire sans vésicule pour les prélèvements d'enfants issu d'une rechute ou au diagnostic (x3,2 vs x1,15), en diminuant principalement le

pourcentage de cellules contenant plus de 5 vésicules. Cependant la restauration de la distribution cytoplasmique du prélèvement en rechute reste partielle, puisque le différentiel avec les valeurs moyennes des prélèvements au diagnostic est persistant (19% vs 58%) (*Figure 24*). Les résultats obtenus, montrent que le PSC-833 agirait au niveau de la distribution cytoplasmique de la DNR pour les prélèvements d'enfants au diagnostic en augmentant la population cellulaire sans vésicules cytoplasmiques, alors qu'aucun effet n'est mesurable pour les adultes au diagnostic (*Figure 24*).



Figure 24 : Pourcentage de cellules ne présentant pas de vésicules cytoplasmiques marquées par la fluorescence de la DNR : comparaison entre prélèvements d'enfants (n = 7) et d'adultes (n = 4) incubés pendant 2 h avec la DNR seule à 2  $\mu$ M ou avec la DNR co-incubée avec le PSC-833 à 5  $\mu$ M.

Le PSC-833 agit plus efficacement sur la distribution cytoplasmique de la DNR pour des prélèvements au diagnostic présentant un ratio relatif au gène mdr1 au-dessus de la moyenne, comme pour le prélèvement N°5 d'enfant (0,27 vs 0,12) et N°11 d'adulte (0,28 vs 0,17) en augmentant le pourcentage de cellules sans vésicule marquée par la DNR (respectivement + 17 et + 30%).

# 7.3. Discussion-Conclusions

Concernant le phénotype MDR associé à la résistance aux anthracyclines, les travaux *in vitro* ont permis de déterminer différents paramètres biologiques à mesurer en clinique comme

l'expression du gène ou de sa protéine d'efflux correspondante, ainsi que des tests fonctionnels comme l'incorporation ou la rétention intracellulaire des anthracyclines.

L'accumulation de la DNR (2 h à 2  $\mu$ M) est le critère d'évaluation de la modulation du phénotype MDR sur des prélèvements leucémiques. La comparaison de dérivés de cyclosporine comme la CSA et le PSC-833 met en évidence une efficacité accrue du PSC-833 à 5  $\mu$ M par rapport à la CSA à 10  $\mu$ M. Ces résultats confirment les résultats encourageants obtenus pour le PSC-833 aussi bien *in vitro* (Jachez et al., 1993), *in vivo* (Boesch et al., 1991) qu'au cours d'essai clinique (Advani et al., 1999, Tidefelt et al., 2000).

L'étude préliminaire sur la distribution cytoplasmique de la DNR concerne principalement des prélèvements leucémiques d'enfants (LAL ; n = 7) et d'adultes (LAM ; n = 4) au diagnostic. Les valeurs moyennes obtenues indiquent une expression relative du gène mdr1 faible. Cependant le faible effectif de LAM évalué peut biaiser l'expression moyenne du gène mdr1. Pour les LAL d'enfants, les études récentes semblent converger plutôt vers l'implication de la LRP et/ou de la MRP (Den Boer et al., 1999, Ogretmen et al., 2000).

Nos expérimentations montrent que la fluorescence de la DNR se distribue (2 µM, 2 h) de façon diffuse dans le compartiment nucléaire et cytoplasmique, mais également au niveau de vésicules cytoplasmiques. Les prélèvements d'adultes (n = 4) et d'enfants (n = 7) au diagnostic sont caractérisés par une population cellulaire prépondérante sans vésicule, et des sous populations comprenant une densité variable de vésicules localisées autour du noyau probablement au niveau du réticulum endoplasmique. Toutefois, les prélèvements d'adultes incluent plus fréquemment des cellules comprenant une densité importante de vésicules dispersées dans le cytoplasme probablement au niveau des lysosomes. L'analyse d'un prélèvement en rechute suggère un phénomène de séquestration de la DNR et une altération de la distribution de la DNR pour certains prélèvements au diagnostic. Lautier et al. discernent également deux alternatives pour la distribution intracellulaire de la fluorescence de la DNR (1 µM, 1 h) qui se caractérisent soit par un marquage nucléaire et cytoplasmique diffus, soit par un faible marquage nucléaire associé à des vésicules intenses périnucléaires (appareil de Golgi) (Lautier et al., 1997). Leurs résultats montrent que ces alternatives ne sont pas liées à l'expression de la P-gp, mais plutôt au caractère différencié (CD34+ / CD34-) des cellules que ce soit pour les lignées cellulaires ou les prélèvements adultes de LAM (CD34+ : n = 10/CD34-: n = 10). Toutefois leurs observations n'indiquent pas d'évaluation quantitative concernant l'homogénéité de la distribution intracellulaire de la fluorescence de la DNR. Les travaux de *Schuurhuis et al.* indiquent par une évaluation quantitative de la DXR la diminution de l'incorporation intracellulaire (0,5  $\mu$ M, 75 min) mais également en terme du ratio nucléo/cytoplasmique (16  $\mu$ M, 1 h) pour des prélèvements de LAM adultes en rechute par rapport aux prélèvements au diagnostic (n = 32) (Schuurhuis et al., 1995). Cependant, leurs observations n'indiquent pas l'apparition de vésicules cytoplasmiques marquées par la fluorescence de la DXR. La combinaison des deux paramètres fonctionnels du phénotype MDR était corrélée avec la surexpression de la P-gp et/ou de l'ARNm de la MRP pour 94% des échantillons étudiés dans cet article.

Nos résultats montrent que le PSC-833 à 5  $\mu$ M restaure plus efficacement la distribution de la DNR des échantillons d'enfants qui présentent un taux d'expression du gène mdr1 supérieur à la moyenne. La concentration de 5  $\mu$ M du PSC-833, légèrement supra-pharmacologique, a été évaluée afin de rester cohérent avec les études effectuées *in vitro* (Merlin et al., 2000) et sur prélèvements de LAM adultes (Merlin et al., 1998). La faible expression moyenne du gène mdr1, la localisation des vésicules marquées par la fluorescence de la DNR ainsi que l'efficacité modeste du PSC-833 semblent indiquer, pour ces prélèvements, un rôle mineur de la P-gp dans la redistribution cytoplasmique de la DNR. Par contre l'expression basal du gène mrp1 dans tous les prélèvements évalués pourrait expliquer le caractère partiel de la restauration de la distribution de la fluorescence de la DNR par le PSC-833. *Lautier et al.* indiquent également un effet mineur du PSC-833 à 2  $\mu$ M concernant la restauration de la DNR, pour des prélèvements de LAM adultes présentant une séquestration cytoplasmique de la DNR, ni d'évaluation de la PSC-833 sur la distribution de la DNR, ni d'évaluation de l'expression de MRP (Lautier et al., 1997).
# **PARTIE 2: REPONSE CELLULAIRE AUX ANTHRACYCLINES**

#### 1. Introduction générale

Cette partie expérimentale a pour objectif de comparer *in vitro* deux anthracyclines, l'idarubicine (IDA) et l'épirubicine (EPI). Les modèles cellulaires sont des cellules adhérentes comprenant des lignées cellulaires parentales (MCF-7 et A549) et leurs dérivées résistantes sélectionnées (MCF- $7^{DXR}$ , A549 T<sub>3</sub> et A549 V<sub>3</sub>). La première partie expérimentale a souligné l'intérêt des protéines P-gp et MRP. Ces deux protéines sont impliquées dans les mécanismes d'efflux et de séquestration cytoplasmique d'anthracyclines.

Dans un premier temps, les anthracyclines ont été caractérisées en fonction de *paramètres de pharmacologie cellulaire*. Pour chaque lignée cellulaire, des études d'accumulation et de rétention intracellulaire, puis de distribution intracellulaire, ont été réalisées pour l'IDA et l'EPI.

Dans un second temps, la *réponse cellulaire* des différentes lignées a été analysée pour chaque anthracycline. La cytotoxicité de l'EPI et de l'IDA a été mesurée après différentes durées d'incubation (2 ou 24 h). Le processus de mort cellulaire induite (nécrose, apoptose, mort mitotique) a été déterminé selon l'anthracycline. Puis, différentes voies participant à l'induction et/ou d'altération de l'induction de la mort cellulaire par les anthracyclines ont été évaluées.

## 2. Evaluation de critères de pharmacologie cellulaire

Les expérimentations suivantes comparent les propriétés de l'idarubicine (IDA), par rapport à l'épirubicine (EPI), en fonction du phénotype MDR associé à la P-gp ou MRP.

2.1. Accumulation et cinétique de rétention intracellulaire des anthracyclines

L'incorporation et la rétention cellulaire ont été étudiées pour tous les modèles cellulaires par cytométrie en flux. L'optimisation des concentrations et de la durée de contact a permis d'obtenir un bon rapport/bruit (> 3) au niveau du signal de fluorescence tout en assurant le maintien d'un état de viabilité cellulaire satisfaisant (> 80%).

#### 2.1.1. Accumulation intracellulaire des anthracyclines

Après 2 h d'incubation en présence d'EPI (2  $\mu$ M) ou d'IDA (0,5  $\mu$ M), les cellules sont lavées, mises en suspension et analysées par cytométrie en flux. Le *Tableau 15* présente les valeurs médianes de fluorescence relevées pour les lignées résistantes et normalisées par rapport à la valeur obtenue pour la lignée parentale correspondante. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test Mann-Whitney.

<u> </u>	1	Accumulat	ion (IFR)	on (IFR)				
	EI	PI	IDA					
MCF-7	1,00 <sup>a</sup>	·	1,00 <sup>a</sup>					
MCF-7 <sup>DXR</sup>	0,45	(0,04) <sup>b</sup>	0,12	(0,04)				
A549	1,00 <sup>a</sup>		1,00 <sup>a</sup>					
A549 T <sub>3</sub>	0,58	(0,02)	0,53	(0,04)				
A549 V <sub>3</sub>	0,68	(0,05)	0,96	(0,07)				

Tableau 15 : Accumulation après 2 h d'incubation d'épirubicine (EPI) ou d'idarubicine (IDA) évaluée par l'intensité de fluorescence relative (IFR), mesurée en cytométrie en flux.

<sup>a</sup> Les résultats représentent des rapports moyens d'intensité de fluorescence entre (résistant/sensible) après 2 h d'incubation d'épirubicine (EPI) ou d'idarubicine (IDA) pour les lignées parentales MCF-7, A549, et leurs sous lignées résistantes respectives MCF-7<sup>DXR</sup>, A549 T<sub>3</sub> et A549 V<sub>3</sub>. <sup>b</sup> Ecart type.

Les cinétiques d'incorporation effectuées pour les lignées parentales ont mis en évidence que l'IDA atteint son plateau d'accumulation intracellulaire plus rapidement que l'EPI (données non présentées). En outre, après 2 h d'accumulation, l'IDA est incorporée de façon équivalente pour les lignées A549 et MCF-7, alors que l'EPI s'incorpore en moyenne 2 fois moins pour la lignée A549 par rapport à la lignée MCF-7 (p < 0.05)(données non présentées).

La lignée cellulaire MCF-7<sup>DXR</sup> est un modèle de référence concernant l'aspect fonctionnel du phénotype MDR associé à la P-gp. Pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> la diminution très importante de la fluorescence intracellulaire est mise en évidence aussi bien pour l'EPI que l'IDA. L'activité de la P-gp pour les deux anthracyclines est confirmée en comparant le couple A549/A549 T<sub>3</sub>. Par contre les rapports de fluorescence de l'EPI et de l'IDA sont différents pour le couple de lignées cellulaires A549/A549 V<sub>3</sub>. Concernant l'EPI, la surexpression de la MRP au niveau de la lignée A549 V<sub>3</sub> est associée à une diminution significative de la fluorescence intracellulaire

par rapport à la lignée parentale (p < 0,05). Alors que pour l'IDA, la MRP ne reproduit pas cet effet.

#### 2.1.2. Cinétique de rétention intracellulaire des anthracyclines

Après 2 h d'incubation en présence d'EPI (2  $\mu$ M) ou d'IDA (0,5  $\mu$ M), les cellules sont lavées mises en suspension et analysées par cytométrie en flux après différents temps de rétention (de 0,5 à 24 h plus tard). La *Figure 25* présente les cinétiques de rétention relevées pour chaque lignée. Les intensités de fluorescence relative (IFR) correspondent aux valeurs moyennes d'intensité de fluorescence normalisées par rapport à la valeur obtenue pour la lignée parentale après 2 h de contact.



Figure 25 : Cinétique d'efflux après 2 h d'incubation en présence d'épirubicine (EPI) ou d'idarubicine (IDA) représentée par les intensités de fluorescence relatives (IFR) mesurées par cytométrie en flux pour les lignées A549, A549 T<sub>3</sub>, A549 V<sub>3</sub>, MCF-7 et MCF-7<sup>DXR</sup>.

*Pour les lignées parentales* (A549 et MCF-7), les cinétiques de rétention de l'EPI (*Figure 25*) et de l'IDA (*Figure 25*) indiquent une diminution progressive de la fluorescence mesurée au cours des 8 premières heures de rétention, puis une stabilisation.

*Pour les lignées surexprimant la P-gp* (MCF-7<sup>DXR</sup>, A549 T<sub>3</sub>), les cinétiques de rétention confirment, pour l'EPI et l'IDA (*Figure 25*), le caractère fonctionnel de la P-gp. La diminution initiale rapide de la rétention de fluorescence de l'EPI ou de l'IDA pour les lignées MCF-7<sup>DXR</sup> et A549 T<sub>3</sub> par rapport à leurs lignées cellulaires parentales respectives, traduit un efflux actif. Puis l'IDA et l'EPI atteignent une valeur d'IFR stable. Toutefois, pour la lignée A549 T<sub>3</sub>, comme pour les lignées parentales, 15 h après l'élimination d'anthracycline la fluorescence intracellulaire induite semble augmenter (*Figure 25*).

*Pour la lignée surexprimant la MRP* (A549 V<sub>3</sub>), la cinétique de rétention de l'EPI est biphasique. Elle comprend une diminution précoce et rapide de la fluorescence intracellulaire au cours des 8 premières heures, traduisant l'efflux actif de l'EPI, puis une diminution plus lente jusqu'à sa stabilisation (*Figure* 25). Par contre la rétention de la fluorescence intracellulaire de l'IDA pour la lignée A549 V<sub>3</sub> est dans un premier temps équivalente à sa lignée parentale. Quatre heures après son élimination du milieu, les IFR de l'IDA commencent à diminuer (p < 0,10) puis se stabilisent à un taux inférieur à celui de la lignée A549, traduisant vraisemblablement un efflux actif retardé (*Figure* 25).

# 2.2. Distribution intracellulaire de la fluorescence induite par les anthracyclines

La distribution intracellulaire de la fluorescence de l'EPI et de l'IDA a été étudiée pour tous les modèles cellulaires par microscopie de fluorescence 2D conventionnelle.

# 2.2.1. Distribution comparative pour le couple MCF-7/MCF7<sup>DXR</sup>

Pour la lignée MCF-7, la fluorescence de l'EPI se distribue de façon diffuse dans le compartiment nucléaire. Le cytoplasme est faiblement marqué et sans vésicules cytoplasmiques (*Figure 26a*). La fluorescence de l'IDA se distribue également de façon diffuse dans le compartiment nucléaire et cytoplasmique, mais elle est associée à un marquage de vésicules cytoplasmiques. La densité des vésicules marquées est importante à proximité du noyau, et éparse en périphérie du cytoplasme (*Figure 26b*). Pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>, la fluorescence de l'EPI (*Figure 26c*) et de l'IDA (*Figure 26d*) se distribue exclusivement dans le compartiment cytoplasmique au niveau de vésicules. Toutefois, la localisation des vésicules marquées par la fluorescence de l'IDA semble plus éparse et plus dense que les vésicules marquées par l'EPI.



Figure 26 : Distribution intracellulaire de l'épirubicine (EPI) (a et c) et de l'idarubicine (IDA) (b et d) observée par microscopie en épifluorescence avec un objectif 100X, représentée selon la même dynamique de niveaux de gris. Cellules MCF-7 (a et b), cellules MCF-7<sup>DXR</sup> (c et d). Localisation du noyau par une flèche.

#### 2.2.2. Distribution comparative pour les lignées A549/A549 T<sub>3</sub>/A549 V<sub>3</sub>

Pour la lignée A549, la fluorescence de l'EPI se distribue de façon diffuse dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique sans marquer de vésicules cytoplasmiques (*Figure 27a*). La fluorescence de l'IDA est détectable au niveau du compartiment nucléaire, et se distribue intensément au niveau de vésicules cytoplasmiques réparties de façon homogène en périphérie du cytoplasme et autour du noyau (*Figure 27b*). Pour la lignée A549 T<sub>3</sub>, la distribution de la fluorescence de l'EPI et de l'IDA est cytoplasmique. Pour l'EPI, sa fluorescence se restreint à marquer quelques vésicules cytoplasmique à proximité du noyau (*Figure 27c*). Pour l'IDA, la fluorescence se distribue selon une densité accrue au niveau de vésicules cytoplasmiques à proximité du noyau et de manière éparse dans le cytoplasme (*Figure 27d*).



Figure 27: Distribution intracellulaire de l'épirubicine (EPI) (a, c et e) et de l'idarubicine (IDA) (b, d et f) observée par microscopie de fluorescence avec un objectif 100X, représentée selon la même dynamique de niveaux de gris. Cellules A549 (a et b), cellules A549  $T_3$  (c et d), cellules A549  $V_3$  (e et f). Localisation du noyau par une flèche.

Pour la lignée A549 V<sub>3</sub>, la fluorescence de l'EPI se distribue dans les compartiments nucléaires et cytoplasmiques. Les vésicules cytoplasmiques sont réparties autour du noyau et dans l'ensemble du cytoplasme (*Figure 27e*). Pour l'IDA, le profil de distribution est analogue à celui décrit pour la lignée parentale A549 (*Figure 27f*).

L'analyse des histogrammes de niveaux de gris, associée à celle de l'intensité de fluorescence, confirme les modifications d'accumulation mesurées par cytométrie en flux (données non présentées).

## 2.3. Discussion-Conclusions

Pour les lignées parentales, l'EPI s'incorpore moins rapidement que l'IDA. Pour les lignées résistantes surexprimant soit la P-gp soit la MRP, les cinétiques de rétention de l'EPI confirment les mesures en accumulation, avec une diminution importante et rapide des IFR par rapport aux lignées parentales. En présence de P-gp, l'IDA présente des cinétiques de rétention similaires à celles de l'EPI. Le caractère lipophile de l'IDA, évalué par d'autres équipes, s'est déjà traduit par une incorporation intracellulaire plus rapide et plus importante pour les couples MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup> et/ou K562/K562<sup>DXR</sup> (Bennis et al., 1997, Praet et al., 1996). Pour la lignée surexprimant la MRP, la diminution des IFR par rapport à la lignée parentale apparaît tardivement pour l'IDA.

Notre démarche en microscopie de fluorescence consiste à évaluer après 2 h d'incubation le profil de distribution de la fluorescence des deux anthracyclines, en particulier au niveau du cytoplasme. Pour les lignées parentales, le profil de distribution de l'IDA comprend le noyau et le cytoplasme, associé à un marquage de vésicules. Pour ces mêmes lignées cellulaires, l'EPI se distribue exclusivement dans le compartiment nucléaire. Ces résultats confirment que le caractère lipophile favorise une distribution sub-cellulaire dans le compartiment cytoplasmique (Duffy et al., 1996, Lampidis et al., 1997, Lehne et al., 1996, Lothstein et al., 1992). Pour les lignées surexprimant la P-gp, la fluorescence de l'EPI et de l'IDA se détecte exclusivement au niveau de vésicules appartenant probablement au compartiment golgien. De ce fait, ces résultats confortent nos précédents travaux concernant le rôle du compartiment golgien dans la séquestration des anthracyclines associée à la P-gp (Bour-Dill et al., 2000). Par contre, la distribution de l'IDA pour la lignée surexprimant la MRP se caractérise principalement par un marquage de vésicules cytoplasmiques. Selon les données de la littérature, ces vésicules correspondraient vraisemblablement au réticulum endoplasmique (RE) (Almquist et al., 1995, Flens et al., 1994). Concernant l'EPI, sa distribution est homogène entre le compartiment nucléaire et cytoplasmique avec cependant un marquage de vésicules du RE. Ces résultats indiqueraient que la seule apparition de vésicules marquées par l'EPI refléterait un phénotype résistant associé à un phénomène de séquestration. Alors que pour l'IDA, le profil de distribution étant plus large au départ, la présence de vésicules cytoplasmiques n'est pas suffisante pour indiquer un phénotype de résistance. Concernant la réduction d'incorporation intracellulaire des anthracyclines par la P-gp et la MRP, l'efflux rapide pourrait indiquer une prise en charge prépondérante au niveau de la membrane cytoplasmique, alors qu'un efflux retardé pourrait signifier une prise en charge cytoplasmique (Gottesman, 1993).

## 3. Réponse cellulaire aux anthracyclines

La réponse cellulaire des différents modèles cellulaires après traitement par l'EPI ou l'IDA est évaluée en déterminant l'effet cytotoxique et le mécanisme de mort cellulaire impliqué, puis en évaluant différentes voies d'induction de ces processus.

#### 3.1. Comparaison de la cytotoxicité pour différentes durées d'incubation

#### 3.1.1. Exposition courte : 2 heures

L'exposition courte est définie par une incubation de 2 h avec les anthracyclines, suivie d'une évaluation différée dans le temps (72 h), et correspondant au moins à un temps de doublement pour chaque lignée (*Tableau 16*). Les analyses statistiques sont effectuées en utilisant le test Mann-Whitney.

radicau 10. Cytotoxiche evaluee apres un nationient de 2 il avec i Eri du i Eri, mais mesuree 72 il plus la	Tableau 1	16 : Cytotoxicité	évaluée après un	traitement de	2 h avec l'E	PI ou l'IDA,	mais mesurée	72 h	plus tar
---	-----------	-------------------	------------------	---------------	--------------	--------------	--------------	------	----------

	<i>IC</i> <sub>50</sub> (μM)				
	EP	Ι	ID.	A	
MCF-7	1,9 <sup>a</sup>	(0,5)	0,27	(0,06)	
MCF-7 <sup>DXR</sup>	787	(165)	8,1	(0,4)	
IR	406 <sup>b</sup>		30		
A549	2,7	(0,5)	0,29	(0,02)	
A549 T <sub>3</sub>	69	(13)	1,1	(0,1)	
IR	25		4		
A549 V <sub>3</sub>	44	(12)	2,8	(0,2)	
IR	16		10		

<sup>a</sup> Les résultats représentent l'IC<sub>50</sub> moyenne (écart type) issue au moins de 3 expériences indépendantes.

<sup>b</sup> L'indice de résistance (IR) est calculé à partir du rapport moyen des IC<sub>50</sub> entre la lignée résistante et la lignée parentale.

Pour les lignées parentales, MCF-7 et A549, les  $IC_{50}$  obtenues pour l'EPI sont 10 fois supérieures à celles obtenues pour l'IDA. Pour les lignées cellulaires surexprimant la P-gp, les  $IC_{50}$  obtenues pour l'EPI sont en moyenne 70 fois supérieures à celles obtenues pour l'IDA. Cette cytotoxicité accrue de l'IDA se traduit par des indices de résistance (IR) moyens 6 à 13 fois inférieurs à ceux obtenus avec l'EPI. Pour la lignée cellulaire A549 V<sub>3</sub> surexprimant la MRP, l'IC<sub>50</sub> obtenue pour l'EPI est 15 fois supérieure à celle obtenue pour l'IDA. Cependant l'IR obtenu pour l'EPI est seulement 1,5 fois supérieur à celui obtenu pour l'IDA.

# 3.1.2. Exposition longue : 24 heures

L'exposition longue consiste à incuber les lignées cellulaires pendant 24 h avec les anthracyclines, puis à effectuer l'évaluation de façon différée dans le temps (48 h) et correspondant au moins à un temps de doublement pour chaque lignée (*Tableau 17*). Pour les lignées parentales, MCF-7 et A549, les IC<sub>50</sub> obtenues pour l'EPI sont supérieures à celles obtenues pour l'IDA (p = 0,018). Pour les lignées cellulaires surexprimant la P-gp, l'EPI est également moins cytotoxique que l'IDA, ce qui se traduit aussi bien par les IC<sub>50</sub> que les IR. D'ailleurs, la lignée A549 T<sub>3</sub> ne présente plus de résistance à l'IDA après une durée d'exposition de 24 h (p = 0,10). Pour la lignée cellulaire A549 V<sub>3</sub> surexprimant la MRP, l'IR obtenu pour l'IDA est 1,5 fois inférieur à celui obtenu pour l'EPI avec une IC<sub>50</sub> 7 fois supérieure à celle de l'IDA.

	IC <sub>50</sub> (μM)					
	EF	PI	ID	IDA		
MCF-7	0,20 <sup>a</sup>	(0,07)	0,11	(0,04)		
MCF-7 <sup>DXR</sup>	152	(32)	3,1	(0,7)		
ſR	760 <sup>b</sup>		27			
A549	0,51	(0,26)	0,11	(0,02)		
A549 T <sub>3</sub>	7,5	(0,3)	0,14	(0,03)		
IR	15		1,3			
A549 V <sub>3</sub>	3,3	(1)	0,49	(0,1)		
IR	6,4		4,5			

Tableau 17 : Cytotoxicité évaluée après un traitement de 24 h avec l'EPI ou l'IDA, mais mesurée 48 h plus tard.

<sup>a</sup> Les résultats représentent l'IC<sub>50</sub> moyenne (écart type) issue au moins de 3 expériences indépendantes.

<sup>b</sup> L'indice de résistance (IR) est calculé à partir du ratio moyen des IC<sub>50</sub> entre la lignée résistante et la lignée parentale.

# 3.1.3. Effet de la durée d'incubation

Pour les lignées parentales l'EPI est en moyenne 10 fois plus cytotoxique pour un traitement de 24 h qu'après 2 h de contact (p = 0,025). Pour l'IDA, les IC<sub>50</sub> sont réduites après 24 h d'incubation mais restent du même ordre de grandeur qu'après 2 h de contact (p = 0,0006). Pour les lignées cellulaires surexprimant la P-gp ou la MRP, les IC<sub>50</sub> de l'EPI sont en moyenne 5 à 10 fois plus faibles après une incubation de 24 h (p = 0,025). Pour l'IDA, quel que soit le phénotype, les IC<sub>50</sub> sont réduites en moyenne d'un facteur 6 (p = 0,006). La faible variation des IR obtenus après 2 ou 24 h d'incubation traduit l'impact modéré des longues durées d'incubation pour l'IDA sur sa cytotoxicité contrairement à l'EPI.

#### 3.2. Evaluation de l'impact sur le cycle cellulaire associé au processus de mort cellulaire

Les endommagements cellulaires induits par l'EPI ou l'IDA sont étudiés indirectement par leurs effets sur le cycle cellulaire, évalués en cytométrie en flux. Par ailleurs, la microscopie de fluorescence permet d'évaluer les altérations de l'ADN induites par l'EPI et l'IDA en fonction de critères morphologiques. Les analyses statistiques sont effectuées en utilisant le test Mann-Whitney.

#### 3.2.1. Impact sur le cycle cellulaire

Les cellules sont incubées en présence de  $l^{T}C_{50}$  déterminée pour la lignée parentale et appliquée pour les lignées parentales et leurs dérivées résistantes. Après chaque point de mesure, les cellules sont lavées, mises en suspension et colorées par l'IP, puis leur distribution dans le cycle cellulaire est analysée par cytométrie en flux.

#### Les lignées cellulaires A549/A549 T<sub>3</sub>/A549 V<sub>3</sub>

Pour la lignée A549 après 24 h d'incubation, l'effet de l'EPI se traduit au niveau du cycle cellulaire par un blocage en phase  $G_2/M$  avec une fraction cellulaire 4 fois supérieure à celle du témoin (46% des cellules). Le blocage est stable pendant 24 h, puis disparaît 48 h après la fin du contact avec l'EPI (*Figure 28*). Une population en sub- $G_1$  est détectable avant la fin de l'incubation (5% des cellules). La fraction cellulaire en sub- $G_1$  augmente après 24 h d'incubation et se stabilise pendant 24 h à un taux 9 fois supérieur au témoin, et décroît 48 h après l'élimination de l'EPI du milieu de culture (14% des cellules) (*Figure 28*). Après 24 h d'incubation, l'effet de l'IDA se traduit au niveau du cycle cellulaire par un blocage des cellules en  $G_2/M$  avec une fraction cellulaire 3 fois supérieure à celle du témoin (32% des cellules). Le blocage est stable pendant 48 h après la fin du contact des cellules avec l'IDA (*Figure 28*). Une population cellulaire en sub- $G_1$  est détectable dès 8 h d'incubation avec l'IDA (5%). La fraction cellulaire en sub- $G_1$  augmente après 24 h d'incubation et se stabilise pendant 48 h après la fin du contact des cellules avec l'IDA (5%). La fraction cellulaire en sub- $G_1$  augmente après 24 h d'incubation et se stabilise pendant 48 h après la fin du contact des cellules avec l'IDA (5%). La fraction cellulaire en sub- $G_1$  augmente après 24 h d'incubation et se stabilise

pendant 48 h en moyenne à un taux 15 fois supérieur à celui du témoin (entre 15 et 40% des cellules) (*Figure 28*).



Figure 28 : Evaluation de la variation de la fraction cellulaire (cellules traitées/cellules témoins) en  $G_2/M$  (courbes) et en sub- $G_1$  (histogrammes). Evaluation réalisée pendant et après une exposition de 24 h à l'épirubicine (graphe du haut ; EPI) ou à l'idarubicine (graphe du bas ; IDA) pour les lignées cellulaires A549, A549 T<sub>3</sub> et A549 V<sub>3</sub>.

La *Figure 28* illustre pour la lignée A549 T<sub>3</sub>, le profil de la cinétique d'induction du blocage en G<sub>2</sub>/M par l'EPI qui est analogue à celui obtenu pour la lignée A549, si ce n'est une détection précoce dès 8 h d'incubation. Par contre, la variation de la fraction cellulaire en G<sub>2</sub>/M est inférieure à celle obtenue pour la lignée parentale. L'induction de cellules en sub-G<sub>1</sub> par l'EPI pour la lignée A549 T<sub>3</sub> est détectable 24 h après la fin de l'incubation, mais avec un taux maximal 2 fois supérieur au témoin (5% des cellules) (*Figure 28*). L'effet cellulaire de l'IDA après 24 h d'incubation se traduit au niveau du cycle cellulaire par un blocage en phase G<sub>2</sub>/M avec une fraction cellulaire 4 fois supérieure à celle du témoin (67% des cellules). Le blocage se poursuit pendant 24 h (50% des cellules) pour disparaître 24 h plus tard (*Figure 28*). Les cellules détectées en sub-G<sub>1</sub> augmentent progressivement à partir de 24 h d'incubation avec l'IDA pour rejoindre 24 h plus tard le taux obtenu pour la lignée A549, et comprendre 45% des cellules en sub- $G_1$  48 h après l'élimination de l'IDA du milieu de culture (*Figure 28*).

Pour la lignée A549 V<sub>3</sub>, l'effet de l'EPI se traduit au niveau du cycle cellulaire par un blocage des cellules en phase  $G_2/M$  dès 8 h d'incubation, correspondant à un taux 2 fois supérieur à celui du témoin (18% des cellules) pour atteindre à la fin de l'incubation un taux 4 fois supérieur à celui du témoin (40% des cellules) comparable à celle obtenue pour la lignée A549, puis disparaître progressivement après l'élimination de l'EPI du milieu de culture (*Figure 28*). La population en sub-G<sub>1</sub> est inexistante pendant toute la durée de l'analyse (*Figure 28*). L'IDA induit dès 8 h d'incubation également un blocage des cellules en G<sub>2</sub>/M au niveau du cycle cellulaire. La fraction cellulaire en G<sub>2</sub>/M est 4 fois supérieure à celle du témoin (43% des cellules) après 24 h d'incubation et se stabilise à ce niveau pendant les 48 h qui suivent son élimination du milieu de culture (*Figure 28*). La population en sub-G<sub>1</sub> est détectable seulement en fin d'analyse (< 10% des cellules) (*Figure 28*).

# Les lignées cellulaires MCF-7/ MCF-7<sup>DXR</sup> incubées en présence d'une $IC_{50}$

Pour la lignée parentale MCF-7 après 24 h d'incubation, l'effet de l'EPI se traduit au niveau du cycle cellulaire par un blocage en phase  $G_2/M$  avec un taux 3 fois supérieur à celui du témoin (56% des cellules) (*Figure 29*). Le blocage est stable pendant 24 h pour s'atténuer 48 h après la fin du contact. La population cellulaire en sub- $G_1$  n'est détectable que 48 h après l'élimination de l'EPI du milieu de culture et correspond à un taux 3 fois supérieur au témoin pour 10% de cellules (*Figure 29*). L'IDA induit également un blocage en  $G_2/M$  détectable après 24 h d'incubation, stable pendant 48 h, atteignant un taux maximal de 3,5 correspondant à 50% de cellules (*Figure 29*). La détection d'une population en sub- $G_1$  augmente lentement et progressivement pendant les 48 h qui suivent l'élimination de l'IDA du milieu de culture, pour atteindre un taux 4 fois supérieur à celui obtenu pour le témoin représentant 15% de la population cellulaire totale (*Figure 29*).

Pour la lignée parentale MCF-7<sup>DXR</sup>, ni l'EPI ni l'IDA n'induisent d'effet cellulaire en terme d'induction de blocage du cycle cellulaire ou de population en sub- $G_1$  (*Figure 29*).



Figure 29 : Evaluation de la variation de la fraction cellulaire (cellules traitées/cellules témoins) en  $G_2/M$  (courbes) et en sub- $G_1$  (histogrammes). Evaluation réalisée pendant et après une exposition de 24 h à l'épirubicine (graphe du haut ; EPI) ou à l'idarubicine (graphe du bas ; IDA) pour les lignées cellulaires MCF-7 et MCF-7<sup>DXR</sup>.

#### Concernant les différentes concentrations testées

L'analyse des populations cellulaires a été également effectuée pour des concentrations correspondant à  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> et à l'IC<sub>50</sub>x10. Ces concentrations ont été déterminées pour les lignées cellulaires parentales et appliquées aux lignées cellulaires parentales et dérivées MDR.

Les résultats obtenus pour les concentrations correspondant à  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> n'ont pas induit d'augmentation de variation de fraction cellulaire en G<sub>2</sub>/M ou sub-G<sub>1</sub>. Seuls seront commentés les résultats obtenus pour les lignées réfractaires à l'induction de blocage en G<sub>2</sub>/M et/ou sub-G<sub>1</sub> en présence de l'IC<sub>50</sub>x10

Pour la lignée A549 V<sub>3</sub>, et pour les concentrations correspondantes à l' $IC_{50}x10$ , l'EPI et l'IDA induisent tardivement le blocage en G<sub>2</sub>/M et progressivement une fraction cellulaire en sub-G<sub>1</sub>. Pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>, seule la concentration équivalente à l' $IC_{50}x10$  avec l'IDA provoque un blocage en G<sub>2</sub>/M du cycle à la fin de l'incubation et stable pendant 48 h.

#### 3.2.2. Processus de mort cellulaire

#### 3.2.2.1. Définition des caractères morphologiques

La *Figure 30* illustre les différents marquages de l'ADN cellulaire par le Hoechst 33342. Lorsque les cellules se divisent normalement, des images associées à différentes phases du cycle cellulaire sont reconnaissables, et permettent de distinguer des cellules interphasiques et mitotiques (*Figure 30a-c*). Ce colorant permet également de discriminer les cellules présentant des altérations au niveau de l'ADN, comme les cellules mitotiques aberrantes (*Figure 30d*) ainsi que les cellules en apoptose (*Figure 30i-l*), ou encore les cellules avec des micronoyaux traduisant un endommagement de l'ADN (*Figure 30e et f*). Le marquage à l'IP révèle les cellules endommagées ayant perdu l'intégrité membranaire afin de mettre en évidence principalement les cellules nécrotiques (*Figure 30g et h*).



Figure 30 : Illustration des différents caractères morphologiques cellulaires mis en évidence en microscopie par le marquage au Hoechst 33342 (a - f et i - l)ou à l'iodure de propidium (g et h). Différentes images de mitoses (a c), de cellules multi-nucléées (d), et de cellules comportant des micronoyaux (e et f). Des cellules nécrotiques (g et h). Différentes étapes de l'apoptose ; la margination précoce (i) et tardive (j), les corps apototqiues (k - l).

#### 3.2.2.2. Quantification des populations cellulaires endommagées

Les cellules sont incubées en présence d'EPI ou d'IDA pendant 24 h avec une concentration équivalente à l'IC<sub>50</sub> obtenue pour les lignées parentales et appliquée pour les lignées parentales et leurs dérivées MDR. Après l'incubation, les cellules sont lavées puis colorées par le Hoechst et l'IP pour être observées à l'aide de l'objectif 40x. L'analyse consiste à effectuer des acquisitions d'images sur l'ensemble de la lame d'observation. Les cellules sont marquées simultanément par le Hoechst et l'IP. Pour chaque image, les cellules sont dénombrées grâce au marquage au Hoechst. Puis parmi le nombre total de cellules, sont discriminées les différentes altérations morphologiques de l'ADN.

Les lignées cellulaires A549/A549  $T_3$ /A549  $V_3$  Pour la lignée A549, l'EPI et l'IDA induisent après 24 h de contact l'apparition de cellules caractérisées de façon prépondérante par des figures apoptotiques précoces (3%) et tardives (respectivement 8 et 19%) (*Tableau 18 et Figure 31*). D'autres figures traduisent un phénotype nécrotique ou encore des aberrations mitotiques. Toutefois, ces populations cellulaires ne représentent qu'une proportion mineure parmi les cellules endommagées (*Tableau 18*).



Figure 31 : Dommages induits, pour la lignée A549, après 24 h de contact par l'épirubicine ou l'idarubicine et mis en évidence par le Hoechst (a et b ; d et e) et l'IP (c et f). Illustration de cellules : témoins (a) ; traitées par l'IDA (b et c) ou l'EPI (d - f). Exemples de cellules apoptotiques (petites flèches) marquées au Hoechst (e) et ayant perdu leur intégrité membranaire (c et f). Les images c et e/f proviennent du même champ d'acquisition que pour les images b et d, mais correspondent à un plan de focalisation supérieur.

Pour la lignée A549 T<sub>3</sub>, l'EPI et l'IDA induisent également l'endommagement des cellules. L'IDA génère une répartition des différents types d'endommagement comparable à celle obtenue avec la lignée parentale. L'EPI semble favoriser l'induction d'aberrations mitotiques par rapport à l'induction d'apoptose (*Tableau 18*). Pour la lignée A549 V<sub>3</sub>, ni l'EPI, ni l'IDA n'induit d'endommagement majeur au niveau cellulaire, avec cependant pour l'IDA des figures apoptotiques, de même proportion entre les figures précoces et tardives (*Tableau 18*).



Figure 32 : Dommages induits pour la lignée MCF-7, après 24 h de contact puis 48 h plus tard par l'épirubicine (EPI) ou l'idarubicine (IDA) et marquées par le Hoechst (a, c, e, f, h, et i) et l'IP (b, d, g, et j). Illustration de cellules : témoins à 24 h (a et b) et 48 h plus tard (c et d) ; traitées par l'IDA (e, f, et g) ou l'EPI (h, i, et j) après 24 h de contact (e et h) et 48 h plus tard (f, g et i, j). Cellule nécrotique (longue flèche) marquée au Hoechst (a) et à l'IP (b). Cellules apoptotiques (petites flèches) marquées au Hoechst (f, i) et à l'IP (g, j). Cellules comportant des micronoyaux marquées par le Hoechst (petites flèches épaisses) (f, h). Les images g et j proviennent du même champ d'acquisition que pour les images f et i, mais correspondent à un plan de focalisation supérieur.

*Les lignées cellulaires* MCF-7/MCF-7<sup>DXR</sup>. Pour la lignée MCF-7 et après 24 h d'incubation, ni l'EPI ni l'IDA n'induit d'apoptose majeure (*Tableau 18*). Cependant des figures d'apoptose précoce sont détectées, en particulier avec l'IDA, sans être accompagnées de corps

apoptotiques (*Figure 32*). Les images obtenues 48 h après l'élimination de l'EPI ou de l'IDA suggèrent l'induction de différents endommagements cellulaires, avec des figures d'apoptose précoces, des cellules avec des micronoyaux, et des cellules nécrotiques (*Figure 32*). Pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>, ni l'EPI, ni l'IDA n'induit d'endommagement cellulaire après l'incubation avec l'anthracycline, ou 48 h après son élimination (*Tableau 18*).

L'analyse des cellules en microscopie de fluorescence, après 24 h d'incubation en présence d'une IC<sub>50</sub> d'EPI ou d'IDA, met en évidence l'induction de dommages de l'ADN. Les altérations de l'ADN se traduisent au niveau cellulaire par l'apparition de figures apoptotiques (précoces et/ou tardives), dont la proportion varie en fonction des lignées cellulaires et de l'anthracycline. La correspondance des pourcentages cellulaires présentant un défaut en contenu d'ADN mesurés en cytométrie en flux après élution (sub-G<sub>1</sub>), avec les pourcentages de figures tardives d'apoptose (corps apoptotique) mesurés par microscopie de fluorescence permet de confirmer que les populations en sub-G<sub>1</sub> sont des cellules en apoptose (p = 0.75, Mann-Whitney) (*Tableau 18*). Pour la lignée MCF-7, des figures précoces d'apoptose sont détectées après 24 h d'incubation avec l'EPI ou l'IDA, et ne sont donc pas détectées en cytométrie en flux (*Tableau 18*). Plus tardivement, l'endommagement des cellules en microscopie se traduit par l'apparition de cellules avec des micronoyaux, de figures précoces d'apoptose, ou de nécrose (*Figure 32*).

			IDA					EPI		
	MCF-7	MCF-7 <sup>DXR</sup>	A549	A549 T <sub>3</sub>	A549 V <sub>3</sub>	MCF-7	MCF-7 <sup>DXR</sup>	A549	A549 T <sub>3</sub>	A549 V <sub>3</sub>
Nec	<sup>1</sup> 2(1)	0,5 (0)	3 (4)	2 (1)	2(1)	1 (0)	2,5 (2)	3 (1)	2 (1)	2 (1)
Norm	89 (6)	97 (0)	75 (4)	79 (1)	90 (6)	93 (2)	93 (0)	85 (0)	85 (1)	94 (4)
MN	0 (0)	1 (1)	0,5 (1)	4 (2)	1 (1)	0 (0)	4 (1)	1 (1)	6 (1)	1 (2)
Mar	8 (5)	1 (1)	2,5 (3)	2 (2)	4 (3)	4 (3)	0,5 (0)	3 (2)	1 (1)	1 (2)
CA	1 (2)	0,5 (1)	19 (8)	13 (3)	3 (6)	2 (3)	0 (1)	8 (0)	6 (2)	2 (2)
Sub-G <sub>1</sub>	<sup>2</sup> 2 (1)	3 (2)	15 (4)	17 (4)	5 (2)	2 (1)	2 (1)	8 (3)	5 (3)	2 (1)

Tableau 18 : Modification du marquage de l'ADN induit après 24 h de contact avec l'épirubicine ou l'idarubicine ; quantification soit par la morphologie en microscopie soit par la région du sub- $G_1$  en cytométrie en flux

<sup>1</sup> Pourcentage (écart type) de cellules nécrotiques (Nec), normales (Norm), multi-nucléées (MN), marginées (Mar) ou de cellules incluant des corps apoptotiques (CA) après double marquage Hoechst/IP en microscopie de fluorescence. <sup>2</sup> Pourcentage de cellules (écart type) mis en évidence dans la région du sub- $G_1$  (sub- $G_1$ ) en cytométrie en flux par le marquage à l'IP (cf. matériels et méthodes).

#### 3.3. Discussion-Conclusions

Pour les lignées parentales et après 2 ou 24 h d'incubation, l'IDA est plus cytotoxique que l'EPI. Pour les lignées surexprimant la P-gp l'IDA est également plus cytotoxique que l'EPI après 2 ou 24 h (en moyenne 70 fois). Par ailleurs, les cellules sont en moyenne 10 fois moins résistantes à l'IDA qu'à l'EPI. La vitesse d'incorporation peut expliquer la cytotoxicité accrue de l'IDA, par augmentation de la durée d'exposition à une concentration intracellulaire cytotoxique. Cette interprétation concorde avec les travaux de Garnier-Suillerot qui montrent qu'en présence de surexpression de P-gp, le coefficient d'incorporation est le plus puissant critère prédictif de l'efficacité cytotoxique des anthracyclines (Garnier-Suillerot, 1995). Pour la lignée surexprimant la MRP, l'IDA est plus cytotoxique que l'EPI après 2 ou 24 h (en moyenne 12 fois). En outre, les cellules sont en moyenne 1,5 fois moins résistantes à l'IDA qu'à l'EPI. Par contre, l'accumulation ou la rétention n'ont pas de relation directe avec les  $IC_{50}$ ou les indices de résistance. La distribution intracellulaire semble indiquer que l'IDA implique des sites potentiels d'actions cytoplasmiques contrairement à l'EPI. De ce fait, l'impact de la séquestration cytoplasmique serait moindre pour celle-ci. Cette hypothèse de travail a également déjà été proposée par Duffy et al. qui ont également comparé cytotoxicité et distribution pour l'IDA et l'EPI entre une lignée sensible et résistante de cancer de vessie par surexpression la P-gp (Duffy et al., 1996).

La réponse cellulaire à l'EPI et l'IDA est évaluée pour une durée de contact de 24 h correspondant à une cytotoxicité optimale pour les deux anthracyclines. Pour les lignées résistantes dérivées de la lignée A549 présentant un indice de résistance modéré, l'IDA se caractérise par une augmentation des indices de résistances (IR) avec l'augmentation de la fraction cellulaire bloquée en  $G_2/M$ , et cette relation est opposée à celle de l'EPI. Pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>, l'application de l'IC<sub>50</sub> de la lignée MCF-7 de l'EPI ou de l'IDA, ne permet pas d'obtenir de blocage en  $G_2/M$ , probablement en relation avec son niveau de résistance élevé. L'induction d'arrêt en  $G_2/M$  par les anthracyclines à déjà été décrit pour des modèles cellulaires leucémiques en présence de DXR (Ling et al., 1996), de DNR (Come et al., 1999 a) et/ou d'IDA (Vial et al., 1997), ainsi que pour des modèles cellulaires adhérents en présence d'EPI (Hedenfalk et al., 1997) ou de DXR (Chang et al., 1999, Petak et al., 2000). Nos expérimentations en microscopie ont montré que la population cellulaire mesurée en sub-G<sub>1</sub> correspondait aux figures tardives d'apoptose caractérisées par les corps apoptotiques. Les lignées A549, A549 T<sub>3</sub> et A549 V<sub>3</sub> indiquent une diminution de la fraction cellulaire

apoptotique en parallèle avec l'augmentation de l'IR. Par contre les lignées MCF-7 et MCF- $7^{DXR}$  se sont révélées réfractaires à l'induction de l'apoptose par l'EPI ou l'IDA. La lignée MCF-7, en dépit de sa sensibilité équivalente à celle de la lignée A549, ne présente pas d'induction prépondérante d'apoptose mais une combinaison de différents processus (apoptose, micronoyaux, nécrose). Les données de la littérature concernant le caractère réfractaire à l'apoptose de cette lignée sont contradictoires. Pour les anthracyclines, *Gewirtz* ont montré que la DXR ou l'IDA n'induisent pas l'apoptose des cellules pour des concentrations inférieures à 1  $\mu$ M et une courte durée d'incubation (Fornari et al., 1996, Gewirtz et al., 1998). Alors que *Lucci et al.* ont montré l'induction de l'apoptose pour des concentrations inférieures à 1  $\mu$ M mais pour une durée de contact de 24 h (Lucci et al., 1999 b). Différentes explications ont été proposées pour la lignée MCF-7, à savoir la surexpression de bcl-2 (Sumantran et al., 1995) ou une délétion de la caspase-3 (Kurokawa et al., 1999), des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose. Pour la lignée MCF-7, DXR, la surexpression de la P-gp s'ajoute à ces particularités énoncées précédemment.

La relation existant entre les effets cytostatiques et cytotoxiques induits par les anthracyclines, est définie en fonction de la dose appliquée et du modèle cellulaire. Les travaux de Come et al. sur des lignées leucémiques montrent qu'à des doses modérées (IC<sub>50</sub>) de DNR pour les lignées sensibles HL-60 (0,1 µM, 1 h) ou dérivées MDR (10 µM, 1 h), la réponse cellulaire se caractérise par un arrêt en G<sub>2</sub>/M associée à la mort mitotique (Come et al., 1999 a). Par contre, l'application de l'IC<sub>90</sub> pour les lignées sensibles (1 µM, 1 h) ou résistantes (100 µM, 1 h) implique un arrêt en G<sub>1</sub>/S et associée à une apoptose rapide (Come et al., 1999 a). Les travaux de Petak et al., sur modèles cellulaires adhérents issus de carcinome de colon, montrent également l'implication d'un mécanisme double en présence de DXR. A une faible concentration (0,1 µM, 72 h), les cellules sont bloquées de façon prolongée en G<sub>2</sub>/M et sont associées à une apoptose retardée (initialement pas d'apoptose), alors qu'à de fortes concentrations (0,3 à 3 µM) la DXR induit au niveau cellulaire un arrêt en G<sub>2</sub>/M associé à une importante et rapide apoptose. En outre quel que soit le mécanisme induisant l'apoptose, elle est indépendante de la voie Fas mais associée à l'activation des caspases (Petak et al., 2000). Les résultats de nos expérimentations, effectuées à doses modérées (0,1 à 0,5 µM pendant 24 h selon l'anthracycline) pour des lignées adhérentes semblent coïncider avec les travaux de Petak et al. (Petak et al., 2000). Les résultats montrent que pour les lignées résistantes dérivées de la lignée A549, ou pour la lignée MCF-7, la présence de l'arrêt en G<sub>2</sub>/M ne suffit pas à assurer l'induction de l'apoptose. Par contre l'apoptose majeure induite par l'EPI ou l'IDA est retardée mais systématiquement associée à l'arrêt en  $G_2/M$ . Pour les lignées parentales (MCF-7 et A549), l'IDA induit un blocage en  $G_2/M$  plus long que l'EPI traduisant probablement des lésions de l'ADN accentuées et favorisant l'entrée des cellules dans un processus de mort cellulaire. Pour la lignée A549, traitées par l'EPI ou l'IDA, la détection de cellules apoptotiques précède l'arrêt en  $G_2/M$  et leurs évolutions respectives sont parallèles suggérant au moins deux voies possibles d'induction de l'apoptose. Pour les lignées A549 dérivées résistantes, lorsque les anthracyclines induisent un arrêt du cycle, le processus de mort détecté comprend une balance variable entre apoptose et mort mitotique. Le traitement des lignées résistantes dérivées de la lignée A549 par l'IDA associe une augmentation de l'alpoptose. Les constatations issues des expérimentations pour les cellules résistantes suggèrent que l'induction de l'apoptose par l'EPI est plus liée à l'arrêt en  $G_2/M$  que l'IDA.

L'ensemble de ces données semblent indiquer que le processus de mort cellulaire induit par ces anthracyclines tend, en fonction d'une cytotoxicité accrue et de la dose croissante appliquée, vers la mort mitotique, puis l'apoptose retardée et l'apoptose immédiate. Et le processus de mort cellulaire est associé pour les doses faibles ou modérées à un blocage des cellules en  $G_2/M$ .

3.4. Rôle de P53 dans le processus d'induction de mort cellulaire par les anthracyclines

# 3.4.1. Cinétique d'expression des ARNm

La *Figure 33* illustre la cinétique de l'expression relative de l'ARNm de p53 pour les lignées parentales traitées par l'EPI ou l'IDA à leurs  $IC_{50}$  respectives. L'induction de p53 après exposition à l'EPI ou l'IDA a été détectée pour les deux lignées cellulaires parentales. Toutefois le pic d'induction différent en fonction de l'anthracycline, avec pour l'IDA, une induction majeure avant la fin de l'incubation et qui précède systématiquement celle de l'EPI.



Figure 33 : Cinétique de l'expression relative de l'ARNm de p53 par RT-PCR pendant et après l'exposition à l'épirubicine (EPI) ou à l'idarubicine (IDA), respectivement pour les lignées A549 (graphe du haut) et MCF-7 (graphe du bas). Les données sont exprimées par rapport au RER (p53/gapdh) mesuré sur des cellules non traitées.

Pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>, aucun produit d'amplification de p53 n'a été détecté, c'est pourquoi seuls les résultats obtenus pour les lignées MDR dérivées de la lignée A549 seront présentés (*Figure 34*). Pour la lignée A549 T<sub>3</sub>, l'IDA induit l'expression de p53 comme pour sa lignée parentale à 8 h d'incubation pour disparaître à la fin de l'incubation (*Figure 34*). Pour l'EPI, un décalage semble se produire avec une induction précoce (8 h d'incubation) sans se poursuivre à la fin de l'incubation (*Figure 34*). Pour la lignée A549 V<sub>3</sub>, l'EPI et l'IDA induisent p53 à la fin de leur incubation (*Figure 34*).

L'expression des gènes mdr1 et mrp1 a également été évaluée au cours de cette cinétique dans les mêmes conditions d'application de l'IDA et de l'EPI que précédemment. Ni l'EPI, ni l'IDA n'induit l'expression de ces gènes pour les lignées parentales, ou leur surexpression pour les lignées MDR (données non présentées).



Figure 34 : Evaluation par RT-PCR de l'expression relative de p53, à 8 h et 24 h d'incubation en présence d'EPI ou d'IDA pour les lignées A549, A549 T<sub>3</sub> et A549 V<sub>3</sub>. Les données sont exprimées par rapport au RER (p53/gapdh) mesuré sur des cellules non traitées.

## 3.4.2. Cinétique d'expression protéique

La *Figure 35* illustre l'expression de la protéine P53 pour les lignées cellulaires traitées par l'EPI ou l'IDA, dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe précédent. Pour la lignée A549, L'EPI et l'IDA induisent la protéine P53 selon un profil similaire avec une induction majeure pendant l'incubation (de 4 à 24 h) qui se poursuit au moins pendant 24 h après l'incubation (*Figure 35 A*). Pour la lignée A549 T<sub>3</sub>, l'IDA et l'EPI induisent P53 selon un profil similaire à celui obtenu pour A549. Toutefois, l'intensité de l'induction de P53 semble atténuée pour l'EPI par rapport à l'IDA (*Figure 35B*). Pour la lignée A549 V<sub>3</sub>, l'IDA et l'EPI induisent P53 selon un profil similaire à celui obtenu pour A549. Toutefois, l'intensité de l'induction de P53 semble atténuée pour l'EPI par rapport à l'IDA (*Figure 35B*). Pour la lignée A549 V<sub>3</sub>, l'IDA et l'EPI induisent P53 selon un profil similaire à celui obtenu pour A549.

#### T 1 4 8 24 +24 1 4 8 24 +24



Figure 35 : Induction de la protéine P53, évaluée par *western-blot*, pendant et après exposition à l'IDA ou à l'EPI. Les échantillons témoins non traités se trouvent dans la colonne (T). L'évaluation de l'expression protéique est réalisée pendant le contact avec l'anthracycline (1, 4, 8 et 24 h), puis 24 h après le contact (+ 24). Les résultats sont présentés pour les lignées A549 (A), A549 T<sub>3</sub> (B), A549 V<sub>3</sub> (C), MCF-7 (D) et MCF-7<sup>DXR</sup> (E). L'échelle de masse moléculaire des protéines est indiquée en kDa.

Pour la lignée MCF-7 (*Figure 35D*), l'EPI et l'IDA induisent la protéine P53 selon un profil similaire mais l'intensité d'induction est homogène dans le temps contrairement à la lignée A549. Pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup> (*Figure 35E*), seule l'IDA induit l'expression de P53. L'induction est homogène pendant toute la durée d'évaluation, comme pour la lignée MCF-7, mais selon une intensité très faible.

L'évaluation de l'expression de la protéine Bax permet d'appréhender d'une part le caractère fonctionnel P53 et d'autre part de préciser l'initiation de l'apoptose (*Figure 36*). Seules les lignées parentales, A549 (*Figure 36A*) et MCF-7 (*Figure 36D*), présentent une induction tardive de Bax respectivement à partir de 24 et 8 h d'incubation, et plus intense avec l'IDA.



Figure 36 : Induction de la protéine Bax, évaluée par *western-blot*, pendant et après exposition à l'idarubicine (IDA) ou à l'épirubicine (EPI). Les échantillons témoins non traités se trouvent dans la colonne (T). L'évaluation de l'expression de la protéine est réalisée pendant le contact avec l'anthracycline (1, 4, 8 et 24 h), puis 24 h après le contact (+ 24). Les résultats sont présentés pour les lignées A549 (A), A549 T<sub>3</sub> (B), A549 V<sub>3</sub> (C), MCF-7 (D) et MCF-7<sup>DXR</sup> (E). L'échelle de masse moléculaire des protéines est indiquée en kDa.

#### 3.5. Résultats préliminaires : rôle des céramides

La *Figure 37* illustre l'évolution de la production de céramide au cours de l'incubation en présence de l'IDA ou de l'EPI. Les résultats présentés ont été confirmés au cours d'une seconde évaluation avec l'obtention de profils d'induction analogues.

Le traitement par l'EPI ou l'IDA implique la production de céramide pour les deux lignées parentales. Pour la lignée MCF-7 et quelle que soit l'anthracycline, l'apparition de céramide est progressive et prépondérante pour des temps tardifs d'incubation (24 h). Pour la lignée A549, l'EPI et l'IDA impliquent une production biphasique comprenant une induction précoce (15 et 60 min) et une induction tardive (8 et 24 h).

Toutefois, quelle que soit la lignée évaluée ou la phase d'induction (précoce et tardive), l'IDA semble impliquer une production plus importante de céramides que l'EPI.



Figure 37 : Cinétique de production des céramides pour les lignées parentales MCF-7 et A549 : évaluation de la variation de la fraction de céramide lorsque les cellules sont exposées à une  $IC_{50}$  d'EPI ou d'IDA. Les données sont exprimées par rapport au % de céramide mesuré sur des cellules non traitées.

# 3.6. Discussion-Conclusions

Le rôle de p53 a déjà été montré dans l'induction d'apoptose dépendante d'arrêts en G<sub>1</sub> (Liebermann et al., 1995). Par contre son rôle dans les arrêts en G<sub>2</sub>/M associé à l'apoptose reste controversé. En outre, différents travaux ont montré que la protéine P53 pouvait induire l'expression du gène mdr1, mais sans toutefois indiquer son rôle pour le gène mrp1 (Ogretmen et Safa, 1997). C'est pourquoi, l'expression du gène p53 et de sa protéine a été évaluée pour l'EPI et l'IDA. Pour les lignées parentales, l'induction du gène p53 a été mise en évidence pour l'IDA avant la fin de l'incubation et qui précède systématiquement celle de l'EPI. Aucun produit d'amplification de p53 n'a été détecté pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. Ce résultat s'explique par le phénotype mutant détecté par SSCP, et est concordant avec la description de cette lignée par *Ogretmen et al*. indiquant une délétion de p53 au niveau de l'exon 5 (Ogretmen et Safa, 1997). Cet exon est inclu partiellement dans la région amplifiée au cours de nos expérimentations par RT-PCR. L'IDA et l'EPI induisent, par rapport à la

lignée A549, l'expression du gène p53 plus précocement pour la lignée A549  $T_3$  et plus tardivement pour la lignée A549  $V_3$ . Pour la lignée A549, l'IDA et l'EPI induisent la protéine P53 selon un profil équivalent avec une induction majeure pendant l'incubation (24 h). Les lignées résistantes dérivées de la lignée A549, présentent un profil d'induction de P53 par l'EPI ou l'IDA analogue à la lignée A549, mais avec une intensité accrue pour l'IDA. Pour la lignée MCF-7, l'induction par l'EPI et l'IDA est constante dans le temps. Pour la lignée MCF- $7^{DXR}$ , seule l'IDA induit la protéine P53 selon le même schéma que la lignée parentale mais moins intensément.

L'induction de P53 traduit bien le caractère endommageant des anthracyclines au niveau de l'ADN, mais par contre aucune expression ou surexpression des gènes *mdr1* ou *mrp1* n'a été mesurée par RT-PCR par le traitement de l'EPI ou l'IDA, et ne reflète donc pas un rôle d'activateur d'expression de ces gènes. L'évaluation de la protéine Bax révèle que seule les lignées parentales présentent une induction tardive et plus intense avec l'IDA. Ce résultat pourrait impliquer une altération de l'activation de Bax par la voie P53. D'autre part, l'induction de Bax pour la lignée MCF-7 confirme une altération probable du processus apoptotique dans sa phase terminale.

Les résultats préliminaires de production de céramides par l'EPI et l'IDA, sont issus d'une cinétique d'évaluation en présence de l'IC<sub>50</sub> respective des lignées parentales. Les deux anthracyclines induisent la production de céramide. Toutefois, pour la lignée MCF-7, l'induction serait retardée (24 h) alors que la lignée A549 semble présenter une production précoce (< 1 h) et tardive (> 8 h) de céramide. Une induction précoce suggérerait l'activation de la voie sphingomyélinase (Jaffrezou et al., 1996), qui n'exclue pas son activation et/ou son amplification par la voie céramide synthase (Bose et al., 1995). La production de céramide paraît plus intense après l'exposition à l'IDA dans les deux lignées cellulaires. Cette dernière indication corrobore deux points d'intérêt. Pour la lignée MCF-7, le messager secondaire d'apoptose (céramide) est produit, la protéine P53 et Bax sont activées, sans toutefois se traduire par une induction d'apoptose prépondérante par l'EPI ou l'IDA. L'ensemble de ces données confirme l'hypothèse d'une l'altération de la voie effectrice du processus d'apoptose pour cette souche de MCF-7. Par ailleurs, l'IDA semble activer plus efficacement la production de céramides, en particulier en phase précoce. Cette dernière indication compléterait les différentes mécanismes proposés concernant la cytotoxicité accrue de l'IDA. L'hypothèse de travail, suggérée par différentes équipes, repose sur l'originalité des sites d'actions de l'IDA par rapport aux anthracyclines de référence (nucléaires, sites cytoplasmiques et membranaires accentués). Cette hypothèse est issue d'études comparatives entre cytotoxicité et distribution (Duffy et al., 1996), cytotoxicité et lésions d'ADN (Binaschi et al., 1997) ou par ses propriétés d'interactions avec les composants lipidiques (Gallois et al., 1998, Praet et al., 1996). **CONCLUSIONS-PERSPECTIVES** 

•

# **CHAPITRE IV : CONCLUSIONS - PERSPECTIVES**

# Première partie : distribution intracellulaire de la daunorubicine

La caractérisation *in vitro* de la séquestration de la DNR liée à la surexpression de la P-gp a montré par analyse d'images, que l'appareil de Golgi était le site majeur de séquestration pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>. Le spectre normalisé d'émission de fluorescence de la DNR, caractérisé au niveau du compartiment golgien de ce modèle résistant, semble indiquer la formation de complexes avec des lipides. En outre, la modulation de la distribution cytoplasmique de la DNR, par la combinaison d'inhibiteurs de P-gp à de faibles concentrations, semble suffisante pour restaurer sa cytotoxicité.

# Perspectives :

Le développement d'outils d'analyse d'images en microscopie de fluorescence paraconfocale 3D, et en particulier les techniques de déconvolution de fluorescence, permettrait de cartographier et de quantifier la distribution cytoplasmique de la DNR au niveau des différents sites cytoplasmiques dans le volume cellulaire total. Concernant les modifications spectrales pour la lignée MCF-7<sup>DXR</sup>, il serait nécessaire pour étabir l'implication de l'interaction entre la DNR et les lipides dans le compartiment golgien: i) de déterminer le composant lipidique en cause, ii) de contrôler l'impact des modulateurs permettant une restauration de la distribution de la DNR ainsi que sa cytotoxicité.

Au niveau clinique, le PSC-833 module l'accumulation de la DNR de cellules provenant de prélèvements leucémiques présentant initialement un défaut d'accumulation, et confirme l'intérêt de l'évaluation du phénotype MDR dans la résistance aux anthracyclines. Par contre, l'effet du PSC-833 sur la distribution subcellulaire de la DNR semble partiel, et suggererait un rôle mineur de la P-gp pour la séquestration de la DNR en clinique.

# Perspectives:

Ces résultats préliminaires demandent à être confirmés sur un grand nombre de prélèvements leucémiques. Toutefois concernant l'évaluation de la modulation de la distribution

subcellulaire de la DNR au niveau de prélèvements leucémiques, il serait intéressant d'une part d'ajouter un modulateur spécifique de la MRP, comme le BSO, d'autre part d'appliquer des combinaisons de faibles concentrations d'inhibiteurs de P-gp incluant le PSC-833.

#### Partie 2 : la réponse cellulaire aux anthracyclines

L'impact du caractère lipophile accru de l'IDA vs l'EPI sur l'incorporation intracellulaire et la réponse cellulaire a été évalué *in-vitro* en fonction de la surexpression de la P-gp et de la MRP. L'IDA s'accumule plus rapidement que l'EPI dans les cellules. Néanmoins, l'IDA et l'EPI sont des substrats de la P-gp, alors que contrairement à l'EPI, l'IDA se caractérise par un efflux retardé des cellules surexprimant la MRP. En outre, le marquage de vésicules cytoplasmiques par l'IDA ne correspond pas à un phénotype de résistance, contrairement à l'EPI, mais suggère des sites d'actions cellulaires plus étendus.

## Perspectives :

Concernant l'efflux de l'EPI ou de l'IDA, l'évaluation de l'effet au niveau de la rétention intracellulaire des anthracyclines par des inhibiteurs spécifiques de la P-gp et de la MRP permettrait de confirmer le caractère spécifique de l'efflux mesuré.

Le caractère sensible à ces anthracyclines n'est pas exclusivement associé à l'induction de l'apoptose. Pour les lignées étudiées, l'induction de l'apoptose nécessite l'arrêt en  $G_2/M$  ainsi qu'une induction de P53 fonctionnelle. Ces paramètres, indicateurs d'endommagement de l'ADN, ne sont cependant ni suffisant, ni spécifiques à l'induction de l'apoptose par ces anthracyclines. Il semblerait que deux voies d'induction de l'apoptose co-existent, et que l'EPI soit plus dépendante de la voie associée à l'endommagement de l'ADN. Les résultats préliminaires concernant l'activation de la production de céramide obtenus pour les lignées sensibles semblent converger vers cette hypothèse.

#### Perspectives :

L'implication de sites d'action "extra-nucléaire" de l'IDA restent à démontrer. Afin de déterminer la relation entre les sites d'action et son activité cytotoxique, une approche

consisterait à mesurer l'effet dose-dependant entre l'endommagement de différents sites (ADN, membrane, mitochondrie) pour les deux lignées sensibles (MCF-7 et A549). Ces mesures seraient effectuées par le biais de: i) la quantité et persistance des lésions d'ADN, ii) la production de céramide , iii) la production d'ERO. En outre, le rôle et le mécanisme d'activation des céramides sont nécessaires à la compréhension du processus de mort cellulaire induit pour les lignées sensibles. Pour les modèles cellulaires résistants, la caractérisation de spectres d'émission de fluorescence de l'IDA, au niveau de différents compartiments cytoplasmiques, permettrait de contrôler les propriétés d'interactions particulières de l'IDA avec les composants lipidiques. Par ailleurs, s'il existe des indications dans la littérature concernant l'altération du métabolisme lipidique *in-vitro* pour des modèles cellulaires MDR associés à la MRP.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Advani, R., Saba, H. I., Tallman, M. S., Rowe, J. M., Wiernik, P. H., Ramek, J., Dugan, K., Lum, B., Villena, J., Davis, E., Paietta, E., Litchman, M., Sikic, B. I. et Greenberg, P. L. (1999). Treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia with combination chemotherapy plus the multidrug resistance modulator PSC 833 (Valspodar). Blood, 93, (3),787-95.

2. Agard, D. A., Hiraoka, Y., Shaw, P. J. et Sedat, J. W. (1989). Methods in cell Biology. *Fluorescence microscopy in three-dimensions*. (30), Academic Press, Inc: San Diego, California.

3. Agoff, S. N., Hou, J., Linzer, D. I. et Wu, B. (1993). Regulation of the human hsp70 promoter by p53. Science, 259, (5091),84-7.

4. Aguilar-Santelises, M., Rottenberg, M. E., Lewin, N., Mellstedt, H. et Jondal, M. (1996). Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. Int J Cancer, 69, (2),114-9.

5. Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, J., Roberts, K. et Watson, J. D. (1995). *Biologie Moleculaire de la cellule*. (3 rd Editon), Flammarion Medecine Sciences: Paris, France.

6. Allen, R. T., Cluck, M. W. et Agrawal, D. K. (1998). Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. Cell Mol Life Sci, 54, (5),427-45.

7. Almquist, K. C., Loe, D. W., Hipfner, D. R., Mackie, J. E., Cole, S. P. et Deeley, R. G. (1995). Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. Cancer Res, 55, (1),102-10.

8. Anderson, R. D., Veigl, M. L., Baxter, J. et Sedwick, W. D. (1991). DNA sequence specificity of doxorubicin-induced mutational damage in uvrB- Escherichia coli. Cancer Res, 51, (15),3930-7.

9. Andrieu-Abadie, N., Jaffrezou, J. P., Hatem, S., Laurent, G., Levade, T. et Mercaider, J. J. (1999). L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. Faseb J, 13, (12),1501-10.

10. Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. et Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peucetius var. caesius. Biotechnol Bioeng, 11, (6),1101-10.

11. Archinal-Mattheis, A., Rzepka, R. W., Watanabe, T., Kokubu, N., Itoh, Y., Combates, N. J., Bair, K. W. et Cohen, D. (1995). Analysis of the interactions of SDZ PSC 833 ([3'-keto-Bmt1]-Val2]- Cyclosporine), a multidrug resistance modulator, with P-glycoprotein. Oncol Res, 7, (12),603-10.

12. Bachur, N. R., Gordon, S. L. et Gee, M. V. (1977). Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. Mol Pharmacol, 13, (5),901-10.

13. Barbarics, E., Kronauge, J. F., Cohen, D., Davison, A., Jones, A. G. et Croop, J. M. (1998). Characterization of P-glycoprotein transport and inhibition in vivo. Cancer Res, 58, (2),276-82.

14. Barthwal, R., Mujeeb, A. et Govil, G. (1994). Interaction of daunomycin with deoxydinucleotide d-CpG by two- dimensional proton magnetic resonance techniques. Arch Biochem Biophys, 313, (2),189-205.

15. Belhoussine, R., Morjani, H., Millot, J. M., Sharonov, S. et Manfait, M. (1998). Confocal scanning microspectrofluorometry reveals specific anthracyline accumulation in cytoplasmic organelles of multidrug-resistant cancer cells. J Histochem Cytochem, 46, (12),1369-76.

16. Bell, D. R., Trent, J. M., Willard, H. F., Riordan, J. R. et Ling, V. (1987). Chromosomal location of human P-glycoprotein gene sequences. Cancer Genet Cytogenet, 25, (1),141-8.

17. Belvedere, G., Suarato, A., Geroni, C., Giuliani, F. C. et M, D. I. (1989). Comparison of intracellular drug retention, DNA damage and cytotoxicity of derivatives of doxorubicin and daunorubicin in a human colon adenocarcinoma cell line (LoVo). Biochem Pharmacol, 38, (21),3713-21.

18. Bennis, S., Faure, P., Chapey, C., Hu, Y. P., Fourche, J., ElYamani, J. et Robert, J. (1997). Cellular pharmacology of lipophilic anthracyclines in human tumor cells in culture selected for resistance to doxorubicin. Anti Cancer Drug, 8, (6),610-617.

19. Bennis, S., Ichas, F. et Robert, J. (1995). Differential effects of verapamil and quinine on the reversal of doxorubicin resistance in a human leukemia cell line. Int J Cancer, 62, (3),283-90.

20. Binaschi, M., Capranico, G., Dal Bo, L. et Zunino, F. (1997). Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. Mol Pharmacol, 51, (6),1053-9.

21. Boesch, D., Gaveriaux, C., Jachez, B., Pourtier-Manzanedo, A., Bollinger, P. et Loor, F. (1991). In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. Cancer Res, 51, (16),4226-33.

22. Boland, M. P., Foster, S. J. et LA, O. N. (1997). Daunorubicin activates NFkappaB and induces kappaB-dependent gene expression in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. J Biol Chem, 272, (20),12952-60.

23. Booser, D. J. et Hortorbagyi, G. N. (1994). Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. Drugs, 47, (2),223-58.

24. Bordow, S. B., Haber, M., Madafiglio, J., Cheung, B., Marshall, G. M. et Norris, M. D. (1994). Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. Cancer Res, 54, (19),5036-40.

25. Bose, R., Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z. et Kolesnick, R. (1995). Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. Cell, 82, (3),405-14.

26. Bour-Dill, C., Gramain, M. P., Merlin, J. L., Marchal, S. et Guillemin, F. (2000). Determination of intracellular organelles implicated in daunorubicin cytoplasmic sequestration in multidrug-resistant MCF-7 cells using fluorescence microscopy image analysis. Cytometry, 39, (1),16-25.

27. Brenner, D. E., Galloway, S., Cooper, J., Noone, R. et Hande, K. R. (1985). Improved high-performance liquid chromatography assay of doxorubicin: detection of circulating aglycones in human plasma and comparison with thin-layer chromatography. Cancer Chemother Pharmacol, 14, (2),139-45.

28. Brooks, S. C., Locke, E. R. et Soule, H. D. (1973). Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. J Biol Chem, 248, (17),6251-3.

29. Brown, J. P., Wei, W. et Sedivy, J. M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. Science, 277, (5327),831-4.

30. Burke, T. G., Morin, M. J., Sartorelli, A. C., Lane, P. E. et Tritton, T. R. (1987). Function of the anthracycline amino group in cellular transport and cytotoxicity. Mol Pharmacol, 31, (5),552-6.

31. Campling, B. G., Young, L. C., Baer, K. A., Lam, Y. M., Deeley, R. G., Cole, S. P. et Gerlach, J. H. (1997). Expression of the MRP and MDR1 multidrug resistance genes in small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 3, (1),115-22.

32. Capranico, G., Jaxel, C., Roberge, M., Kohn, K. W. et Pommier, Y. (1990 a). Nucleosome positioning as a critical determinant for the DNA cleavage sites of mammalian DNA

topoisomerase II in reconstituted simian virus 40 chromatin. Nucleic Acids Res, 18, (15),4553-9.

33. Capranico, G., Kohn, K. W. et Pommier, Y. (1990 b). Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin. Nucleic Acids Res, 18, (22),6611-9.

34. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. et Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res, 47, (4),936-42.

35. Chang, B. D., Xuan, Y., Broude, E. V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J. et Roninson, I. B. (1999). Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. Oncogene, 18, (34),4808-18.

36. Chang, J., Kim, D. H., Lee, S. W., Choi, K. Y. et Sung, Y. C. (1995). Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein. J Biol Chem, 270, (42),25014-9.

37. Chomczynski, P. et Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 162, (1),156-9.

38. Chou, T. C. et Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul, 22,27-55.

39. Clynes, M., Heenan, M. et Hall, K. (1993). Human cell lines as models for multidrug resistance in solid tumours. Cytotechnology, 12, (1-3),231-56.

40. 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. et Deeley, R. G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science, 258, (5088),1650-4.

41. Cole, S. P., Chanda, E. R., Dicke, F. P., Gerlach, J. H. et Mirski, S. E. (1991). Non-Pglycoprotein-mediated multidrug resistance in a small cell lung cancer cell line: evidence for decreased susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II. Cancer Res, 51, (13),3345-52.

42. Coley, H. M., Twentyman, P. R. et Workman, P. (1993). The efflux of anthracyclines in multidrug-resistant cell lines. Biochem Pharmacol, 46, (8),1317-26.

43. Come, M. G., Bettaieb, A., Skladanowski, A., Larsen, A. K. et Laurent, G. (1999 b). Alteration of the daunorubicin-triggered sphingomyelin-ceramide pathway and apoptosis in MDR cells: influence of drug transport abnormalities. Int J Cancer, 81, (4),580-7.
44. Come, M. G., Skladanowski, A., Larsen, A. K. et Laurent, G. (1999 a). Dual mechanism of daunorubicin-induced cell death in both sensitive and MDR-resistant HL-60 cells. Br J Cancer, 79, (7-8),1090-7.

45. Crompton, N. E. (1997). Telomeres, senescence and cellular radiation response. Cell Mol Life Sci, 53, (7),568-75.

46. Dalton, W. S., Grognan, T. M. et Rybski, J. A. (1989). Immunohistochemical detection and quantification of P-gp in multiple drug resistant human myeloma cells association of drug resistant and drug accumulation. Blood, 1731,747-52.

47. Dano, K., Frederiksen, S. et Hellung-Larsen, P. (1972). Inhibition of DNA and RNA synthesis by daunorubicin in sensitive and resistant Ehrlich ascites tumor cells in vitro. Cancer Res, 32, (6),1307-14.

48. Delpy, E., Hatem, S. N., Andrieu, N., de Vaumas, C., Henaff, M., Rucker-Martin, C., Jaffrezou, J. P., Laurent, G., Levade, T. et Mercadier, J. J. (1999). Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes. Cardiovasc Res, 43, (2),398-407.

49. Den Boer, M. L., Pieters, R., Kazemier, K. M., Janka-Schaub, G. E., Henze, G. et Veerman, A. J. (1999). Relationship between the intracellular daunorubicin concentration, expression of major vault protein/lung resistance protein and resistance to anthracyclines in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia, 13, (12),2023-30.

50. Dhooge, C. et De Moerloose, B. (1999). Clinical significance of P-glycoprotein (P-gp) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Results of a 6-year prospective study. Adv Exp Med Biol, 457,11-9.

51. Di Marco, A., Gaetani, M., Dorigotti, L., Soldati, M. et Bellini, O. (1963). Studi sperimentali sull'attivata' antineoplasica del nuevo antibiotico daunomicina. Tumori, 49,203-17.

52. Di Marco, A., Silvestrini, R., Di Marco, S. et Dasdia, T. (1965). Inhibiting effect of the new cytotoxic antibiotic daunomycin on nucleic acids and mitotic activity of HeLa cells. J Cell Biol, 27, (3),545-50.

53. Dubost, M., Ganter, P., Mancy, D., Maral, R., Ninet, L. et Preud'Homme, J. (1965). Rufochromomycin (5278 RP), cytostatic antibiotic. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D, 261, (22),4911-3.

54. Dubost, M., Granter, P., Maral, R., Ninet, L. et Pinnert, S. (1963). Un nouvel antibiotique à propriétés cytostatiques: la rubidomycine, *C. R. Academie des Sciences*, 1813-15.

55. Duffy, P. M., Hayes, M. C., Cooper, A. et Smart, C. J. (1996). Confocal microscopy of idarubicin localisation in sensitive and multidrug-resistant bladder cancer cell lines [see comments]. Br J Cancer, 74, (6),906-9.

56. Durrieu, F., Belaud-Rotureau, M. A., Lacombe, F., Dumain, P., Reiffers, J., Boisseau, M. R., Bernard, P. et Belloc, F. (1999). Synthesis of Bcl-2 in response to anthracycline treatment may contribute to an apoptosis-resistant phenotype in leukemic cell lines. Cytometry, 36, (2),140-9.

57. Durrieu, F., Belloc, F., Lacoste, L., Dumain, P., Chabrol, J., Dachary-Prigent, J., Morjani, H., Boisseau, M. R., Reiffers, J., Bernard, P. et Lacombe, F. (1998). Caspase activation is an early event in anthracycline-induced apoptosis and allows detection of apoptotic cells before they are ingested by phagocytes. Exp Cell Res, 240, (2),165-75.

58. el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. et Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. Nat Genet, 1, (1),45-9.

59. Endicot, J. A. et Ling, V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. Annu Rev Biochem, 58,135-71.

60. Feilotter, H., Lingner, C., Rowley, R. et Young, P. G. (1992). Regulation of the G2mitosis transition. Biochem Cell Biol, 70, (10-11),954-71.

61. Feinstein, E., Canaani, E. et Weiner, L. M. (1993). Dependence of nucleic acid degradation on in situ free-radical production by adriamycin. Biochemistry, 32, (48),13156-61.

62. Feller, N., Kuiper, C. M., Lankelma, J., Ruhdal, J. K., Scheper, R. J., Pinedo, H. M. et Broxterman, H. J. (1995). Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry [published erratum appears in Br J Cancer 1996 Dec;74(12):2042]. Br J Cancer, 72, (3),543-9.

63. Ferraro, C., Quemeneur, L., Prigent, A. F., Taverne, C., Revillard, J. P. et Bonnefoy-Berrard, N. (2000). Anthracyclines trigger apoptosis of both G0-G1 and cycling peripheral blood lymphocytes and induce massive deletion of mature T and B cells. Cancer Res, 60,1901-07.

64. Flens, M. J., Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Fritz, J. M., Meijer, C. J., Scheper, R. J. et Zaman, G. J. (1994). Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. Cancer Res, 54, (17),4557-63.

65. Ford, J. M. et Hait, W. N. (1993). Pharmacologic circumvention of multidrug resistance. Cytotechnology, 12, (1-3),171-212.

66. Fornari, F. A., Jr., Jarvis, D. W., Grant, S., Orr, M. S., Randolph, J. K., White, F. K. et Gewirtz, D. A. (1996). Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin. Biochem Pharmacol, 51, (7),931-40.

67. Fornari, F. A., Randolph, J. K., Yalowich, J. C., Ritke, M. K. et Gewirtz, D. A. (1994). Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. Mol Pharmacol, 45, (4),649-56.

68. Forssen, E. A., Male Brune, R., Adler Moore, J. P., Lee, M. J., Schmidt, P. G., Krasieva, T. B., Shimizu, S. et Tromberg, B. J. (1996). Fluorescence imaging studies for the disposition of daunorubicin liposomes (DaunoXome) within tumor tissue. Cancer Res, 56, (9),2066-75.

69. Fulda, S., Friesen, C., Los, M., Scaffidi, C., Mier, W., Benedict, M., Nunez, G., Krammer, P. H., Peter, M. E. et Debatin, K. M. (1997). Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors [see comments]. Cancer Res, 57, (21),4956-64.

70. Fulda, S., Susin, S. A., Kroemer, G. et Debatin, K. M. (1998). Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. Cancer Res, 58, (19),4453-60.

71. Gallois, L., Fiallo, M. et Garnier-Suillerot, A. (1998). Comparison of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles circular dichroism study. Biochim Biophys Acta, 1370,31-40.

72. Gallois, L., Fiallo, M., Laigle, A., Priebe, W. et Garnier-Suillerot, A. (1996). The overall partioning of anthracyclines into phosphatidyl-containing model membranes depends neither on the drug charge nor the presence of the anionic phospholipids. Eur J Biochem, 241,879-87.
73. Garnier-Suillerot, A. (1995). Impaired accumulation of drug in multidrug resistant cells. What are the respective contributions of the kinetics of uptake and of P-glycoprotein mediated efflux of drug. Curr Pharm Design, 1,69-82.

74. Gartenhaus, R. B., Wang, P. et Hoffmann, P. (1996). Induction of the WAF1/CIP1 protein and apoptosis in human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with adriamycin by using a p53-independent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 93, (1),265-8.

75. Gervasoni, J. E., Jr., Fields, S. Z., Krishna, S., Baker, M. A., Rosado, M., Thuraisamy, K., Hindenburg, A. A. et Taub, R. N. (1991). Subcellular distribution of daunorubicin in P-

glycoprotein-positive and -negative drug-resistant cell lines using laser-assisted confocal microscopy. Cancer Res, 51, (18),4955-63.

76. Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochem Pharmacol, 57, (000-015).

77. Gewirtz, D. A., Randolph, J. K., Chawla, J., Orr, M. S. et Fornari, F. A. (1998). Induction of DNA damage, inhibition of DNA synthesis and suppression of c-myc expression by the anthracycline analog, idarubicin (4-demethoxy- daunorubicin) in the MCF-7 breast tumor cell line. Cancer Chemother Pharmacol, 41, (5),361-9.

78. Giaccone, G., van Ark-Otte, J., Rubio, G. J., Gazdar, A. F., Broxterman, H. J., Dingemans, A. M., Flens, M. J., Scheper, R. J. et Pinedo, H. M. (1996). MRP is frequently expressed in human lung-cancer cell lines, in non- small-cell lung cancer and in normal lungs. Int J Cancer, 66, (6),760-7.

79. Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. et Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J Natl Cancer Inst, 51, (5),1417-23.

80. Goldstein, L. J., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1992). Multidrug resistance in human cancer. Crit Rev Oncol Hematol, 12, (3),243-53.

81. Gottesman, M. M. (1993). How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. Cancer Res, 53, (4),747-54.

82. Gramain, M. P. (2000). Caractérisation tridimensionnelle d'un microscope optique à fluorescence. Comportement du système et modélisation associée, correction de l'élongation axiale, applications en cancérologie. Nancy, INPL, Doctorat de l'INPL, 158.

83. Gramain, M. P., Bour, C., Chomik, A., Dieterlin, A., Haeberlé, O., Meyer, J. J., Marchal, S., Merlin, J. L. et Guillemin, F. (1997). Fluorescence microscopy image deconvolution : application to anthracycline distribution in breast cancer cells. Proceedings of SPIE, 3197,187-93.

84. Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. et Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res, 54, (18),4855-78.

85. Greene, R. F., Collins, J. M., Jenkins, J. F., Speyer, J. L. et Myers, C. E. (1983). Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. Cancer Res, 43, (7),3417-21.

86. Guerci, A., Merlin, J. L., Missoum, N., Feldmann, L., Marchal, S., Witz, F., Rose, C. et Guerci, O. (1995). Predictive value for treatment outcome in acute myeloid leukemia of cellular daunorubicin accumulation and P-glycoprotein expression simultaneously determined by flow cytometry. Blood, 85, (8),2147-53.

87. Gussow, D., Rein, R., Ginjaar, I., Hostenbach, F., Seemann, G., Kottman, A. et Ploegh, H. (1987). The human  $\beta_2$ -microglobulin gene, primary structure and definition of the transcriptionnal unit. J Immunol, 139,3132-38.

88. Hannun, Y. A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. Science, 274, (5294),1855-9.

89. Hedenfalk, I. A., Baldetorp, B., Borg, A. et Oredsson, S. M. (1997). Activated cell cycle checkpoints in epirubicin-treated breast cancer cells studied by BrdUrd-flow cytometry. Cytometry, 29, (4),321-7.

90. Hindenburg, A. A., Gervasoni, J. E., Jr., Krishna, S., Stewart, V. J., Rosado, M., Lutzky, J., Bhalla, K., Baker, M. A. et Taub, R. N. (1989). Intracellular distribution and pharmacokinetics of daunorubicin in anthracycline-sensitive and -resistant HL-60 cells. Cancer Res, 49, (16),4607-14.

91. Hollo, Z., Homolya, L., Hegedus, T. et Sarkadi, B. (1996). Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. FEBS Lett, 383, (1-2),99-104.

92. Hortobagyi, G. N., Bodey, G. P., Buzdar, A. U., Frye, D., Legha, S. S., Malik, R., Smith, T. L., Blumenschein, G. R., Yap, H. Y. et Rodriguez, V. (1987). Evaluation of high-dose versus standard FAC chemotherapy for advanced breast cancer in protected environment units: a prospective randomized study. J Clin Oncol, 5, (3),354-64.

93. Horton, L. E., Qian, Y. et Templeton, D. J. (1995). G1 cyclins control the retinoblastoma gene product growth regulation activity via upstream mechanisms. Cell Growth Differ, 6, (4),395-407.

94. Hwang, M., Ahn, C. H., Pine, P. S., Yin, J. J., Hrycyna, C. A., Licht, T. et Aszalos, A. (1996). Effect of combination of suboptimal concentrations of P-glycoprotein blockers on the proliferation of MDR1 gene expressing cells. Int J Cancer, 65, (3),389-97.

95. Innocente, S. A., Abrahamson, J. L., Cogswell, J. P. et Lee, J. M. (1999). p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. Proc Natl Acad Sci U S A, 96, (5),2147-52.

96. Isaacs, R. J., Davies, S. L., Wells, N. J. et Harris, A. L. (1995). Topoisomerase II $\alpha$  and  $\beta$  as therapy targets in breast cancer. Anti-Cancer Drugs, 6,195-211.

97. Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Schroeijers, A. B., van der Valk, P. et Scheper, R. J. (1996). Major vault protein LRP-related multidrug resistance. Eur J Cancer, 32A, (6),979-84.

98. Jachez, B., Nordmann, R. et Loor, F. (1993). Restoration of taxol sensitivity of multidrugresistant cells by the cyclosporine SDZ PSC 833 and the cyclopeptolide SDZ 280-446. J Natl Cancer Inst, 85, (6),478-83.

99. Jaffrezou, J. P., Levade, T., Bettaieb, A., Andrieu, N., Bezombes, C., Maestre, N., Vermeersch, S., Rousse, A. et Laurent, G. (1996). Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. Embo J, 15, (10),2417-24.

100. Jiang, X. R., Kelsey, S. M., Wu, Y. L. et Newland, A. C. (1995). Circumvention of Pglycoprotein-mediated drug resistance in human leukaemic cells by non-immunosuppressive cyclosporin D analogue, SDZ PSC 833. Br J Haematol, 90, (2),375-83.

101. Johnson, P. A., Clements, P., Hudson, K. et Caldecott, K. W. (1999). A mitotic spindle requirement for DNA damage-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. Cancer Res, 59, (11),2696-700.

102. Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. et Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res, 51, (23 Pt 1),6304-11.

103. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. et Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 26, (4),239-57.

104. Kurokawa, H., Nishio, K., Fukumoto, H., Tomonari, A., Suzuki, T. et Saijo, N. (1999). Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. Oncol Rep, 6, (1),33-7.

105. Labroille, G., Belloc, F., Bilhou-Nabera, C., Bonnefile, S., Bascans, E., Boisseau, M. R., Bernard, P. et Lacombe, F. (1998). Cytometric study of intracellular P-gp expression and reversal of drug resistance. Cytometry, 32,86-94.

106. Laigle, A., Fiallo, M. M. L. et Garnier-Suillerot, A. (1996). Spectral shape modifications of anthracyclines bound to cell nuclei: a microspectrofluorometric study. Chem. Biol. Interact., 101, (1),49-58.

107. Lampidis, T. J., Kolonias, D., Podona, T., Israel, M., Safa, A. R., Lothstein, L., Savaraj, N., Tapiero, H. et Priebe, W. (1997). Circumvention of P-GP MDR as a function of anthracycline lipophilicity and charge. Biochemistry, 36, (9),2679-85.

108. Lautier, D., Bailly, J. D., Demur, C., Herbert, J. M., Bousquet, C. et Laurent, G. (1997). Altered intracellular distribution of daunorubicin in immature acute myeloid leukemia cells. Int J Cancer, 71, (2),292-9.

109. Lavie, Y., Cao, H., Bursten, S. L., Giuliano, A. E. et Cabot, M. C. (1996). Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. J Biol Chem, 271, (32),19530-6.

110. Lavie, Y., Cao, H., Volner, A., Lucci, A., Han, T. Y., Geffen, V., Giuliano, A. E. et Cabot, M. C. (1997). Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. J Biol Chem, 272, (3),1682-7.

111. Lavie, Y., Fiucci, G., Czarny, M. et Liscovitch, M. (1999). Changes in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug resistant cancer cells. Lipids, 34 Suppl,S57-63.

112. Lehne, G., Deangelis, P., Clausen, O. P. F. et Rugstad, H. E. (1996). Human hepatoma cells rich in P-glycoprotein are sensitive to aclarubicin and resistant to three other anthracyclines. Br J Cancer, 74, (11),1719-1729.

113. Li, X., Melamed, M. R. et Darzynkiewicz, Z. (1996). Detection of apoptosis and DNA replication by differential labeling of DNA strand breaks with fluorochromes of different color. Exp Cell Res, 222, (1),28-37.

114. Liao, W. C., Haimovitz-Friedman, A., Persaud, R. S., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Zhang, N., Gatei, M., Lavin, M., Kolesnick, R. et Fuks, Z. (1999). Ataxia telangiectasiamutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. J Biol Chem, 274, (25),17908-17.

115. Liebermann, D. A., Hoffman, B. et Steinman, R. A. (1995). Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. Oncogene, 11, (1),199-210.

116. Ling, Y. H., el-Naggar, A. K., Priebe, W. et Perez-Soler, R. (1996). Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. Mol Pharmacol, 49, (5),832-41.

117. Ling, Y. H., Priebe, W., Yang, L. Y., Burke, T. G., Pommier, Y. et Perez-Soler, R. (1993). In vitro cytotoxicity, cellular pharmacology, and DNA lesions induced by annamycin,

an anthracycline derivative with high affinity for lipid membranes. Cancer Res, 53, (7),1583-9.

118. List, A. F. (1996). Role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia. Leukemia, 10, (6),937-42.

119. List, A. F., Spier, C. S., Grogan, T. M., Johnson, C., Roe, D. J., Greer, J. P., Wolff, S. N., Broxterman, H. J., Scheffer, G. L., Scheper, R. J. et Dalton, W. S. (1996). Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. Blood, 87, (6),2464-9.

120. Liu, Y. Y., Han, T. Y., Giuliano, A. E. et Cabot, M. C. (1999). Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. J Biol Chem, 274, (2),1140-6.

121. Lizard, G., Fournel, S., Genestier, L., Dhedin, N., Chaput, C., Flacher, M., Mutin, M., Panaye, G. et Revillard, J. P. (1995). Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. Cytometry, 21, (3),275-83.

122. Loe, D. W., Deeley, R. G. et Cole, S. P. (1996). Biology of the multidrug resistanceassociated protein, MRP. Eur J Cancer, 32A, (6),945-57.

123. Longhurst, T. J., GM, O. N., Harvie, R. M. et Davey, R. A. (1996). The anthracycline resistance-associated (ara) gene, a novel gene associated with multidrug resistance in a human leukaemia cell line. Br J Cancer, 74, (9),1331-5.

124. Lothstein, L., Wright, H. M., Sweatman, T. W. et Israel, M. (1992). N-benzyladriamycin-14-valerate and drug resistance: correlation of anthracycline structural modification with intracellular accumulation and distribution in multidrug resistant cells. Oncol Res, 4, (8-9),341-7.

125. Lucci, A., Cho, W. I., Han, T. Y., Giuliano, A. E., Morton, D. L. et Cabot, M. C. (1998). Glucosylceramide: a marker for multiple-drug resistant cancers. Anticancer Res, 18, (1B),475-80.

126. Lucci, A., Han, T. Y., Liu, Y. Y., Giuliano, A. E. et Cabot, M. C. (1999 a). Modification of ceramide metabolism increases cancer cell sensitivity to cytotoxics. Int J Oncol, 15, (3),541-6.

127. Lucci, A., Han, T. Y., Liu, Y. Y., Giuliano, A. E. et Cabot, M. C. (1999 b). Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells. Cancer, 86, (2),300-11.

128. Mansat-de Mas, V., Bezombes, C., Quillet-Mary, A., Bettaieb, A., AD, D. o., Laurent, G. et Jaffrezou, J. P. (1999). Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N- terminal kinase activation and apoptosis induced by daunorubicin. Mol Pharmacol, 56, (5),867-74.

129. Marie, J. P. et Legrand, O. (1999). MDR1/P-GP expression as a prognostic factor in acute leukemias. Adv Exp Med Biol, 457,1-9.

130. Marquardt, D. et Center, M. S. (1992). Drug transport mechanisms in HL60 cells isolated for resistance to adriamycin: evidence for nuclear drug accumulation and redistribution in resistant cells. Cancer Res, 52, (11),3157-63.

131. Mason, W. T. (1993). Biological Techniques. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, Academic Press: London, UK.

132. Merlin, J. L., Azzi, S., Lignon, D., Ramacci, C., Zeghari, N. et Guillemin, F. (1992). MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. Eur J Cancer, 28A, (8-9),1452-8.

133. Merlin, J. L., Bour-Dill, C., Marchal, S., Ramacci, C., Poullain, M. G. et Giroux, B. (2000). Modulation of Daunorubicin cellular resistance by Combination of P-glycoprotein blockers acting on drug efflux and intracellular sequestration in Golgi. Cytometry, in press.

134. Merlin, J. L., Guerci, A., Marchal, S., Missoum, N., Ramacci, C., Humbert, J. C., Tsuruo, T. et Guerci, O. (1994). Comparative evaluation of S9788, verapamil, and cyclosporine A in K562 human leukemia cell lines and in P-glycoprotein-expressing samples from patients with hematologic malignancies. Blood, 84, (1),262-9.

135. Merlin, J. L., Guerci, A. P., Marchal, S., Bour, C., Colosetti, P., Kataki, A. et Guerci, O. (1998). Influence of SDZ-PSC833 on daunorubicin intracellular accumulation in bone marrow specimens from patients with acute myeloid leukaemia. Br J Haematol, 103, (2),480-7.

136. Merlin, J. L., Marchal, S., Ramacci, C., Dieterlen, A., Schultz, G., Lucas, C., Poullain, M. G. et Berlion, M. (1995 a). Influence of S9788, a new modulator of multidrug resistance, on the cellular accumulation and subcellular distribution of daunorubicin in P-glycoprotein-expressing MCF7 human breast adenocarcinoma cells. Cytometry, 20, (4),315-23.

137. Merlin, J. L., Marchal, S., Ramacci, C., Notter, D. et Vigneron, C. (1995 b). Modulation of daunorubicin intracellular accumulation in P-glycoprotein expressing MCF-7 human breast adenocarcinoma cells by thermosensitive- liposome encapsulation and hyperthermia. Int J Hyperthermia, 11, (6),855-65.

138. Michieli, M., Damiani, D., Ermacora, A., Raspadori, D., Michelutti, A., Grimaz, S., Fanin, R., Russo, D., Lauria, F., Masolini, P. et Baccarani, M. (1997). P-glycoprotein (PGP) and lung resistance-related protein (LRP) expression and function in leukaemic blast cells. Br J Haematol, 96, (2),356-65.

139. Molinari, A., Cianfriglia, M., Meschini, S., Calcabrini, A. et Arancia, G. (1994). Pglycoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells. Int J Cancer, 59, (6),789-95.

140. Momparler, R. L., Karon, M., Siegel, S. E. et Avila, F. (1976). Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. Cancer Res, 36, (8),2891-5.

141. Muggia, F. M. et Green, M. D. (1991). New anthracycline antitumor antibiotics. Crit Rev Oncol Hematol, 11, (1),43-64.

142. Munger, C., Ellis, A., Woods, K., Randolph, J., Yanovich, S. et Gewirtz, D. (1988). Evidence for inhibition of growth related to compromised DNA synthesis in the interaction of daunorubicin with H-35 rat hepatoma. Cancer Res, 48, (9),2404-11.

143. Noonan, K. E., Beck, C., Holzmayer, T. A., Chin, J. E., Wunder, J. S., Andrulis, I. L., Gazdar, A. F., Willman, C. L., Griffith, B., Von Hoff, D. D. et et al. (1990). Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A, 87, (18),7160-4.

144. Nooter, K., Brutel de la Riviere, G., Look, M. P., van Wingerden, K. E., Henzen-Logmans, S. C., Scheper, R. J., Flens, M. J., Klijn, J. G., Stoter, G. et Foekens, J. A. (1997). The prognostic significance of expression of the multidrug resistance- associated protein (MRP) in primary breast cancer. Br J Cancer, 76, (4),486-93.

145. Nooter, K., Burger, H. et Stoter, G. (1996). Multidrug resistance-associated protein (MRP) in haematological malignancies. Leuk Lymphoma, 20, (5-6),381-7.

146. Nooter, K., Westerman, A. M., Flens, M. J., Zaman, G. J., Scheper, R. J., van Wingerden, K. E., Burger, H., Oostrum, R., Boersma, T., Sonneveld, P. et et al. (1995). Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. Clin Cancer Res, 1, (11),1301-10.

147. Ogretmen, B., Barredo, J. C. et Safa, A. R. (2000). Increased expression of lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein messenger RNA in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol, 22, (1),45-9.

148. Ogretmen, B. et Safa, A. R. (1997). Expression of the mutated p53 tumor suppressor protein and its molecular and biochemical characterization in multidrug resistant MCF- 7/Adr human breast cancer cells. Oncogene, 14, (4),499-506.

149. Padilla Ybarra, J. J. (1999). Biopsie Optique par Spectroscopie de Fluorescence des Tissus vivants : Spectroscopie UV, Microspectrofluorescence, Spectroscopie Résolue dans le Temps. Conception Instrumentale, Traitement Automatique du Signal et Modélisation. Nancy, INPL, Doctorat de l'INPL, 193.

150. Parkins, C. S., Chadwick, J. A. et Chaplin, D. J. (1996). Inhibition of intracellular pH control and relationship to cytotoxicity of chlorambucil and vinblastine. Br J Cancer Suppl, 27, S75-7.

151. Passalaris, T. M., Benanti, J. A., Gewin, L., Kiyono, T. et Galloway, D. A. (1999). The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways. Mol Cell Biol, 19, (9),5872-81.

152. Patrick, C. W., McIntire, J. et McIntire, L. V. (1995). Technique for visualization and quantification of three dimensionnal intracellular ion measurements in vascular endothelial cells. Review of Scientific Instrumentation, 66, (3),2476-92.

153. Petak, I., Tillman, D. M., Harwood, F. G., Mihalik, R. et Houghton, J. A. (2000). Fasdependent and -independent mechanisms of cell death following DNA damage in human colon carcinoma cells. Cancer Res, 60, (10),2643-50.

154. Pignon, B., Morjani, H., Vilque, J. P., Millot, J. M., Simon, G., Lartigue, B., Etienne, J. C., Potron, G. et Manfait, M. (1995). In vitro study of THP-doxorubicin retention in human leukemic cells using confocal laser microspectrofluorometry. Leukemia, 9, (8),1361-7.

155. Plo, I., Bettaieb, A., Payrastre, B., Mansat-De Mas, V., Bordier, C., Rousse, A., Kowalski-Chauvel, A., Laurent, G. et Lautier, D. (1999). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway is activated by daunorubicin in human acute myeloid leukemia cell lines. FEBS Lett, 452, (3),150-4.

156. Praet, M., Stryckmans, P. et Ruysschaert, J. M. (1996). Cellular uptake, cytotoxicity, and transport kinetics of anthracyclines in human sensitive and multidrug-resistant K562 cells. Biochem Pharmacol, 51, (10),1341-8.

157. Prat, W., Ruffon, R. W., Ensminger, W. D. et Maybaum, J. (1994) In W. Prat (ed.) *Principles of cancer chemotherapy*. Oxford University Press Inc, New York, Vol. sec edition.

158. Priebe, W. et Perez Soler, R. (1993). Design and tumor targeting of anthracyclines able to overcome multidrug resistance: a double-advantage approach. Pharmacol Ther, 60, (2),215-34.

159. Robert, J. et Gianni, L. (1993). Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. Cancer Surveys, 17,219-51.

160. Rohlff, C. et Glazer, R. I. (1995). Regulation of multidrug resistance through the cAMP and EGF signalling pathways [published erratum appears in Cell Signal 1996 Feb;8(2):151]. Cell Signal, 7, (5),431-43.

161. Scheper, R. J., Broxterman, H. J., Scheffer, G. L., Kaaijk, P., Dalton, W. S., van Heijningen, T. H., van Kalken, C. K., Slovak, M. L., de Vries, E. G., van der Valk, P. et et al. (1993). Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P- glycoprotein-mediated multidrug resistance. Cancer Res, 53, (7),1475-9.

162. Schneider, E., Cowan, K. H., Bader, H., Toomey, S., Schwartz, G. N., Karp, J. E., Burke, P. J. et Kaufmann, S. H. (1995). Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed acute leukemia. Blood, 85, (1),186-93.

163. Schuurhuis, G. J., Broxterman, H. J., de Lange, J. H., Pinedo, H. M., van Heijningen, T. H., Kuiper, C. M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Kalken, C. K., Baak, J. P. et et al. (1991). Early multidrug resistance, defined by changes in intracellular doxorubicin distribution, independent of P-glycoprotein. Br J Cancer, 64, (5),857-61.

164. Schuurhuis, G. J., Broxterman, H. J., Ossenkoppele, G. J., Baak, J. P., Eekman, C. A., Kuiper, C. M., Feller, N., van Heijningen, T. H., Klumper, E., Pieters, R. et et al. (1995). Functional multidrug resistance phenotype associated with combined overexpression of Pgp/MDR1 and MRP together with 1-beta-D- arabinofuranosylcytosine sensitivity may predict clinical response in acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res, 1, (1),81-93.

165. Shapiro, A. B., Fox, K., Lee, P., Yang, Y. D. et Ling, V. (1998). Functionnal intracellular P-glycoprotein. Int J Cancer, 76,857-64.

166. Shotton, D. M. (1995). Robert Feulgen Lecture 1995 . Electronic light microscopy: present capabilities and future prospects. Histochemistry and Cell Biology, 104,97-137.

167. Siegfried, J. M., Sartorelli, A. C. et Tritton, T. R. (1983). Evidence for the lack of relationship between inhibition of nucleic acid synthesis and cytotoxicity of adriamycin. Cancer Biochem Biophys, 6, (3),137-42.

168. Sit, K. H., Yin, L. et Paramanantham, R. (1997). Apoptotic condensations in M-phase cells. Anat Rec, 248, (2),149-58.

169. Skladanowski, A. et Konopa, J. (1994). Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumour cells. Biochem Pharmacol, 47, (12),2269-78.

170. Skovsgaard, T., Nielsen, D., Maare, C. et Wassermann, K. (1994). Cellular resistance to cancer chemotherapy. Int Rev Cytol, 156,77-157.

171. Skovsgaard, T. et Nissen, N. I. (1982). Membrane transport of anthracyclines. Pharmacol Ther, 18, (3),293-311.

172. Smith, A. J., Mayer, U., Schinkel, A. H. et Borst, P. (1998). Availability of PSC833, a substrate and inhibitor of P-glycoproteins, in various concentrations of serum. J Natl Cancer Inst, 90, (15),1161-6.

173. Solis Recendez, G. (1999). Action des taxanes sur les cellules tumorales humaines et la mise en évidence in-vivo d'interactions avec les anthracyclines. Paris, Paris XII, Doctorat de Pharmacologie, 210.

174. Soussi, T., Caron de Fromentel, C. et May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. Oncogene, 5, (7),945-52.

175. Spector, D. L., Goldmann, R. D., A., L. L. et Schaeffer, S. (1998). Cells (a laboratory manual). *Light Microscopy and cell structure*. (2), Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL Press): New York, USA.

176. Speth, P. A., Linssen, P. C., Boezeman, J. B., Wessels, H. M. et Haanen, C. (1987 a). Leukemic cell and plasma daunomycin concentrations after bolus injection and 72 h infusion. Cancer Chemother Pharmacol, 20, (4),311-5.

177. Speth, P. A., Linssen, P. C., Boezeman, J. B., Wessels, H. M. et Haanen, C. (1987 b). Cellular and plasma adriamycin concentrations in long-term infusion therapy of leukemia patients. Cancer Chemother Pharmacol, 20, (4),305-10.

178. Sumantran, V. N., Ealovega, M. W., Nunez, G., Clarke, M. F. et Wicha, M. S. (1995). Overexpression of Bcl-XS sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res, 55, (12),2507-10.

179. Suzuki-Takahashi, I., Kitagawa, M., Saijo, M., Higashi, H., Ogino, H., Matsumoto, H., Taya, Y., Nishimura, S. et Okuyama, A. (1995). The interactions of E2F with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRB and p107 by a cyclin-dependent kinase. Oncogene, 10, (9),1691-8.

180. Tapiero, H., Nguyen Ba, G. et Lampidis, T. J. (1994). Cross resistance relevance of the chemical structure of different anthracyclines in multidrug resistant cells. Pathol Biol Paris, 42, (4),328-37.

181. Terret, C., Le Cesne, A., Lagarde, N., Di Palma, M., Goncalves, E., Yataghene, Y., Funck-Brentano, C., N'Guyen, J. P., Marino, J. P., Besse, B., Armand, J. P., Le Chevalier, T.,

Belpomme, D., Misset, J. L., D'Agay, L., Berger, E., Sarkany, M. et Giroux, B. (1996). S9788 a multidrug resistance (MDR) reversing agent: French phase I studies with 6-hour continuous infusion schedule in combination with chemotherapy in patients with refractory cancer. 37, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 165.

182. Tew, K. D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. Cancer Res, 54, (16),4313-20.

183. Tewey, K. M., Chen, G. L., Nelson, E. M. et Liu, L. F. (1984). Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. J Biol Chem, 259, (14),9182-7.

184. Tidefelt, U., Liliemark, J., Gruber, A., Liliemark, E., Sundman-Engberg, B., Juliusson, G., Stenke, L., Elmhorn-Rosenborg, A., Mollgard, L., Lehman, S., Xu, D., Covelli, A., Gustavsson, B. et Paul, C. (2000). P-Glycoprotein inhibitor valspodar (PSC 833) increases the intracellular concentrations of daunorubicin in vivo in patients with P- glycoprotein-positive acute myeloid leukemia. J Clin Oncol, 18, (9),1837-44.

185. Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M. et Nishida, E. (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage- induced G2 checkpoint. Embo J, 17, (10),2728-35.

186. Trock, B. J., Leonessa, F. et Clarke, R. (1997). Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance [see comments]. J Natl Cancer Inst, 89, (13),917-31.

187. Trussardi, A., Poitevin, G., Gorisse, M. C., Faroux, M. J., Bobichon, H., Delvincourt, C. et Jardillier, J. C. (1998). Sequential overexpression of LRP and MRP but not P-gp 170 in VP16- selected A549 adenocarcinoma cells. Int J Oncol, 13, (3),543-8.

188. Tso, J. Y., Sun, X. H., Kao, T. H., Reece, K. S. et Wu, R. (1985). Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. Nucleic Acids Res, 13, (7),2485-502.

189. Versantvoort, C. H., Bagrij, T., Wright, K. A. et Twentyman, P. R. (1995). On the relationship between the probenecid-sensitive transport of daunorubicin or calcein and the glutathione status of cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein (MRP). Int J Cancer, 63, (6),855-62.

190. Vial, J. P., Belloc, F., Dumain, P., Besnard, S., Lacombe, F., Boisseau, M. R., Reiffers, J. et Bernard, P. (1997). Study of the apoptosis induced in vitro by antitumoral drugs on leukaemic cells [see comments]. Leuk Res, 21, (2),163-72.

191. Wang, C. S., LaRue, H., Fortin, A., Gariepy, G. et Tetu, B. (1997). mdr1 mRna expression by Rt-Pcr in patients with primary breast cancer submitted to neoadjuvant therapy. Breast Cancer Res Treat, 45, (1),63-74.

192. Watanabe, T., Kokubu, N., Charnick, S. B., Naito, M., Tsuruo, T. et Cohen, D. (1997). Interaction of cyclosporin derivatives with the ATPase activity of human P-glycoprotein. Br J Pharmacol, 122, (2),241-8.

193. Welch, P. J. et Wang, J. Y. (1992). Coordinated synthesis and degradation of cdc2 in the mammalian cell cycle. Proc Natl Acad Sci U S A, 89, (7),3093-7.

194. Wyllie, A. H. (1997). Apoptosis and carcinogenesis. Eur J Cell Biol, 73, (3),189-97.

195. Young, I. T., Zagers, H., Van Vliet, L. J., Boddeke, F. R. et Netten, H. (1993). Depth-offocus in Microscopy, SCIA'93 Proceedings 8<sup>th</sup> Scandinavian Conference on Image Analysis, 493-98.

# ANNEXES

.

# Fluorescence microscopy image deconvolution : application to anthracycline distribution in breast cancer cells

and the second second

Marie-Pierre Gramain<sup>1,2</sup>, Corinne Bour<sup>2</sup>, Alain Chomik<sup>3</sup>, Alain Dieterlen<sup>3</sup>, Olivier Haeberlé<sup>3</sup>, Jean-Jacques Meyer<sup>3</sup>, Sophie Marchal<sup>2</sup>, Jean-Louis Merlin<sup>2</sup>, and François Guillemin<sup>1</sup>

 <sup>1</sup> Laboratoire de recherche en Instrumentation Médicale Automatisée en Cancérologie (IMAC, CRAN URA CNRS D0821)
 <sup>2</sup> Laboratoire de Recherche en Oncologie (LRO)
 Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-Les-Nancy. France
 <sup>3</sup> Laboratoire d'Electronique, Université de Haute-Alsace, 61, rue Albert Camus, F-68093 Mulhouse Cédex, France

## ABSTRACT

Video epifluorescence microscopy and image analysis are used for studying anthracycline resistance in breast cancer cells. In order to perform a semi-quantitative image analysis, several deconvolution algorithms are tested and validated on model beads. The most performant algorithm is applied to fluorescent biological specimens. We show that deconvolution makes image segmentation easier. Semi-quantitative measurements on resulting images are correlated with results obtained by cytometry.

Keywords : Epifluorescence microscopy, deconvolution, semi-quantification, image analysis, anthracycline resistance, breast cancer.

## 1. INTRODUCTION

Epifluorescence microscopy is a powerful tool for noninvasive examination of living biological samples. But its major drawback is the blurring of images by out-of-focus informations<sup>1</sup>. In our case, this phenomenon can be lowered by reducing as much as possible the biological specimen thickness : living cells directly cultured on slides spread out on the support. Image resolution can be improved by applying two dimensional (2D) deconvolution. These procedure implies the measurement of the Point Spread Function (PSF) of the entire imaging system. The PSF characterizes the optical instrument and the acquired image may be regarded as the result of a convolution of the object with the PSF. The inverse process consists in restoring the original object and is called deconvolution. We use four iterative restoration algorithms to generate estimates of the object<sup>2</sup>. The algorithms are tested and compared in terms of image quality, noise robustness and convergence speed. We select the best fitted algorithm to our biological study : the distribution of daunorubicin, a fluorescent anthracyclin used in chemiotherapy.

## 2. MATERIALS AND METHODS

## 2.1 Microscope

In our experiment, we use an AX 70 PROVIS epifluorescence microscope (Olympus, France), equipped with a 100 W mercury vapor lamp. Two filter sets are employed : a 460-490 nm band-pass excitation filter, 505 nm dichroic mirror and a 510-550 nm band-pass barrier filter are used for beads inspection, and a 400-440 nm band-pass excitation filter, 570 nm dichroïc mirror and a 590 nm long-pass barrier filter for daunorubicin detection. A high numerical aperture (NA=1.35), 100x oil immersion objective lens is used for all experiments (oil refractive index = 1.516). This high quality objective is corrected for spherical and chromatic aberranous.

SPIE Vol. 3197 • 0277-786X/97/\$10.00

The microscope is equipped with a COHU 4910 video integration Charge-Coupled Device (CCD) camera (Biorad, France), which allows live fluorescence observation and frame averaging. Its pixel size is  $8.6(H) \times 8.3(V) \ \mu m^2$  and the total image size is  $768 \times 574$  pixels. The images are encoded over 8 bits (256 grey levels).

We also use a LH 1600 Peltier cooled CCD camera (LHESA, France). This imaging device has many advantages in biological microscopy where low level images must be recorded. This detector combines high sensitivity, high photometric linearity and a wide dynamic range<sup>3</sup>. The pixel size is  $9 \times 9 \ \mu\text{m}^2$  and the total image size is  $1536 \times 1024$  pixels. Images are 12 bits encoded (4096 grey levels).

## 2.3 Point spread function measurements

All deconvolution algorithms we used need the knowledge of the Point Spread Function (PSF), which describes the optical behavior of the imaging system<sup>4</sup>. It is essentially determined by the optical properties of the sample and the objective<sup>5</sup>. It is therefore necessary to record it carefully. To do so, one must acquire the image of a point light source. A fluorescent bead can be considered as a point source if its diameter is smaller than the resolution of the microscope given by  $\Re = 0.61\lambda$  / NA;  $\lambda$  is the wavelength of observation and NA is the numerical aperture of the microscope objective. Thus, at  $\lambda$ =515 nm, maximum of emission of fluorescein isothiocyanate (FITC), and NA = 1.35, the resolution is  $\Re = 0.23\mu$ m. We choose 0.16±0.003 µm diameter latex beads loaded with FITC (Polysciences, France). An appropriate concentration of beads is placed between coverslip and slide into a Phosphate Buffered Saline (PBS) solution in order to measure the PSF with the same refractive index than in a biological environment. The PSF is measured at the two wavelengths (515 nm and 590 nm) needed for beads images and biological specimen images deconvolution.

#### 2.4 Deconvolution algorithms

The image given by the acquisition system can be modelled by a convolution operation:

$$\mathbf{g} = \mathbf{h} \otimes \mathbf{f} + \mathbf{n} \tag{1}$$

where g is the recorded image, h is the point spread function, f is the object, the  $\otimes$  operator represents the convolution operation and n represents all noise sources.

To obtain an estimate of the object from the image, one has to proceed to a deconvolution. Many different deconvolution techniques are available, among them we choose four iterative algorithms  $^{6, 7}$ . The Jansson-Van Cittert (JVC) algorithm derives from a deterministic image formation model. Its iterative solution is given by:

$$\mathbf{f}^{n+i} = \mathbf{f}^n + \mu \Big[ \mathbf{g} - \mathbf{h} \otimes \mathbf{f}^n \Big]$$
(2)

The coefficient  $\mu$  is a constant relaxation factor which permits to control the convergence speed. When using an adaptative relaxation factor, one obtains the Gold-Meinel (GM) algorithm given by:

$$f^{n+1} = f^n \frac{g}{h \otimes f^n}$$
(3)

The Lucy-Richardson (LR) algorithm derives from a Bayesian image formation model, in which the noise follows a Poisson distribution. It involves two convolution operations and gives the  $f^{-1}$  estimate from the f<sup>o</sup> ones by:

$$f^{n+1} = f^{n}\left[\left(\frac{g}{h \otimes f^{n}}\right) \otimes h\right]$$
(4)

188

The Maximum a posteriori method (MAP) results from another solution of the same Bayesian model and is given by:

$$f^{n+1} = f^n \exp\left[\left(\frac{g}{h \otimes f^n} - 1\right) \otimes h\right]$$
 (5)

These four algorithms are tested and compared in terms of convergence speed, image quality and noise robustness. Convergence properties are evaluated by computing the quadratic error (QE) calculated from the difference between the acquired image g, and the estimate resulting from the convolution of  $f^n$  by h:

$$QE = \frac{\sqrt{\sum \left[g - h \otimes f^{n}\right]^{2}}}{Nb}$$
(6)

Nb represents the total number of pixels in the image. Deconvolution algorithms have been implemented and tested under MATLAB using the Toolbox Images (The MATH WORKS Inc.). Matlab offers a very convenient environment for matrix processing, the drawback being a large computing time, as Matlab is an interpreted language.

#### 2.5 Model beads

The deconvolution algorithms are first tested on calibrated fluorescent beads with a 2±0.04  $\mu$ m diameter. Calibrated relative intensities beads with respectively 0.5%, 1%, 3%, 10%, 30% and 100% fluorescence intensity and with a 2.5 $\mu$ m diameter (InSpeck<sup>TM</sup> Green, Molecular Probes, USA) are also used to verify that deconvolution has no influence on intensity measurements (maximum excitation at  $\lambda$ =490 nm and emission maximum at  $\lambda$ =515 nm).

#### 2.6 Biological specimen

The intracellular daunorubicin (DNR, Roger Bellon, France) distribution is studied by video fluorescence microscopy. We try to measure its distribution from fluorescence images and to correlate our results with those from another technique commonly used in this type of study : the flow cytometry.

The MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line is studied. The cells are cultured in phenol red-free RPMI 1640 (GibcoBRL, France) supplemented with 10 % fetal calf serum in a 37°C, 5% CO, atmosphere, and are tested after 3 days of growing. Conditions of culture are defined by studying the growing and time-doubling of cells. Cells are cultured on 75 cm<sup>2</sup> plastic flasks for flow cytometry and on slideflasks (Polylabo, France) for microscopy. We work with a concentration of  $10^4$  cells/ml for both techniques<sup>8</sup>.

Cells are incubating with  $2 \mu M$  of daunorubicin at 37°C for different periods : 15, 30, 60, 90, 120, and 180 minutes in order to study intracellular accumulation. At the end of incubation time, cells are washed with 2 ml of PBS (GibcoBRL, France). Sideflasks are immediately observed in microscopy. This support maintains living cells in their biological environment and allows them to stay adherent during observation. This method reduces considerably the thickness of the samples and therefore out of focus information in epifluorescent observations.

For flow cytometry, we work with a concentration of  $10^6$  cells/ml and cells are resuspended in 100 µl of PBS. The measurements are performed using an Orthocyte flow cytometer (Ortho Diagnostic Systems), with 488 nm excitation and a 590 nm long-pass filter for DNR detection <sup>9</sup>.

#### 2.7 Image processing procedure

Images are processed with the AnalySIS Pro software (SIS, Germany). For each type of relative intensity fluorescence beads, <sup>taw</sup> and restored images are segmented to highlight Regions of Interest (RI). Pixel grey levels of each RI are summed. The <sup>tesult</sup> is divided by the area of the region of interest and gives the average intensity for each RI. A mean result is calculated <sup>by</sup> averaging the values obtained for each RI of the same sample. A semi-quantitative result is then gained by dividing the <sup>thean</sup> results by the maximum mean result measured for the sample containing the 100% relative intensity beads <sup>1</sup>.

189

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Deconvolution algorithm evaluation

Voise robustness and image quality : deconvolution algorithms are evaluated using  $2\pm0.04 \ \mu m$  diameter fluorescent beads. Two cameras are fixed onto two ports of the microscope. Images of the same field are recorded by each camera. The raw mages are deconvolved using the four algorithms presented in section 2.4 (see Figure 1).

Ve observed that the GM deterministic algorithm has a tendency to diverge : this is due to the presence of noise in the cquired images, particularly in those from the COHU camera. We therefore had to stop after only two iterations for these lgorithms. For stochastic algorithms, such a divergence has not been observed. Note that images of biological specimen ontaminated by large out-of-focus blur can be considered as noisy images. This explains that deterministic algorithms often ul to properly deconvolve this kind of images.

rtefacts appear as the number of iterations increases. For instance, the use of the LR algorithm induces side and wave ffects on the restored image. These effects are less important when using the MAP algorithm. Furthermore, our quasi-binary nages imply the apparition of rings along the object edges. When deconvolution is successful, the background is removed nd fine image details appear with great contrast.

onvergence speed : at each iteration, the quadratic error is calculated between the object image and the estimated image onvolved by the measured PSF. On Figure 2, we can see that stochastic algorithms (LR and MAP) converge much more owly than deterministic ones (JVC and GM), except for the GM algorithm which rapidly diverges when using COHU tages. Note that the quadratic error is smaller for the LHESA camera. This indicates that this type of camera presents a tter signal to noise ratio. For the same number of iterations, stochastic algorithms are more time consuming than terministic algorithms. In fact, stochastic algorithms involve two convolution operations at each iteration versus one for terministic algorithms.

## )HU Camera :



ESA Camera :



tre 1: Raw images (a and b) of fluorescent beads recorded by the COHU and LHESA cameras and deconvolved by four tithms. Jansson-Van Cittert (JVC) and Gold-Meinel (GM) algorithms were stopped after 2 iterations because of tgence problems. The Lucy-Richardson (LR) and Maximun *a posteriori* (MAP) algorithms were run for 20 iterations.

「日本に、日本にないための」



gure 2 : Convergence of the deconvolution algorithms for COHU and LHESA images.

#### Algorithm choice

algorithms lead to ringing artefacts on beads images. Futhermore, side effects appear with the LR algorithm. The image ity is similar using the JVC and the MAP algorithms. Even if stochastic algorithms are time consuming, they are much z robust with respect to noise. We therefore select the MAP algorithm as being a bit faster than the LR method when z LHESA camera images. Deconvolution is an efficient tool to enhance our images and facilitate segmentation edures.

g the relative intensity fluorescence beads, we then verified the linearity of our acquisition system, which allows us to orm not only specimen observation but also semi-quantitative studies. We also verified on bead images that the semititative intensity measurements are weakly (less than 5%) affected by the number of iterations used in the deconvolution iss. We stop it when the quadratic error no more changes meaningfully, typically after 20 iterations for our samples of -7 human breast adenocarcinoma cells.

## ological results

rubicin is incorporated in MCF-7 cells for different times of incubation. In microscopy studies, three fields of view per isk are recorded using the LHESA camera which appeared to be the best fitted detector. This procedure is repeated ind finally 15-30 cells are processed per samples.

tubicin distribution for increasing incubation durations is shown on raw images (a), (b), (c) of Figure 3. Images (a'), d (c') show the results after deconvolution. Deconvolution improves the image contrast, enhance the object contours refore facilitate the image segmentation.

sulate the ratio of fluorescence measured with cytometry and optical microscopy, for increasing incubation durations. Io is calculated on raw and deconvolved images. Resulting curves are presented on Figure 4. Data are normalized to t value at 15 mm of incubation time. Increasing of fluorescence intensity reveals daunorubicin accumulation. We d by cytometry that the intracellular distribution increases up to 60 min, and remains constant after this duration.

rocessing results present higher standard deviations than data obtained from cytometry. To improve the results, one fore to process a larger number of cells and to improve the biological homogeneity of the samples.

be noted that the 3 hours incubation time measurement seams to be meaningless in microscopy. Membranes cells are d as predicted by cytotoxic tests. Thus intracellular DNR accumulation is promoted. In flow cytometry, this mon is not observed since the selected analysis area allows to eliminate dead cells by granulometric criteria. This cell iation was not implemented in our microscopic analisys. Nevertheless, this image analysis method brings us a curve for DNR accumulation in sensitive MCF-7 cells if cellular viability is respected. Therefore, similar nts may be performed on the MCF-7<sup>DXR</sup> resistant cell line in which DNR incorporation is significantly different.

191



gure 3 : Evolution of daunorubicin intracellular distribution at  $2\mu$ M on EUT Coeffs, for incubation times of z (a) 15 min. (c) 180 min. Images (a), (b), and (c) show the results of the Eucercolation of tractory and z by the MAP gorithm after 10 iterations.





ality west wat with the second sec

## 4. CONCLUSION

Four 2D deconvolution algorithms have been used on 2D images from a fluorescence optical microscope. The acquisition system has been characterized by PSFs measurements. In order to determine the best fitted algorithm, we performed deconvolution on test specimens (2µm diameter fluorescent beads). It appeared that the Maximum *a posteriori* algorithm is the most appropriated in terms of noise robustness and image quality.

We have shown by comparison with flow cytometry that semi-quantitative analysis can be performed by image processing. Furthermore, deconvolution makes segmentation easier, especially on complex biological images.

We applied optical microscopy to follow the daunorubicin incorporation kinetic in sensitive MCF-7 cells. The promising results we obtained allow us to consider the same study on the MCF-7<sup>DXR</sup> resistant cell line.

At the moment, we limited the semi-quantitative study to fluorescence intensity in the whole cell in order to compare this method with known cytometric results<sup>9</sup>. The next step will consist in applying this protocol to subcellular analysis which can only be performed by flow cytometry using tritiated daunorubicin<sup>10</sup>.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the french "Ligue Nationale de Lutte contre le Cancer", Centre Alexis Vautrin and by Olympus. France.

## REFERENCES

S. Inoué, "Video Microscopy ", Plenum Press., New York, 1991.

D. A. Agard, Y. Hiraoka, P. Shaw and J.W. Sedat, "In fluorescence microscopy living cells in culture : Part B quantitative fluorescence microscopy-imaging and spectroscopy", Y.L. Wang and D.L. Taylor Eds, *Academic Press*, New York, 1989.

Y. Hiraoka, J.W. Sedat, and D.A. Agard, "The use of charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures", *Science*, 238, pp. 36-41, 1987.

C.W. Patrick and L.V. McIntire, "Technique for visualization and quantification of three dimensional intracellular ion measurements in vascular endothelial cells", *Rev. Sci. Instrum.*, 66(3), pp.2476-2492, 1995.

B.A. Scalettar, J.R. Swedlow, J.W. Sedat and D.A. Agard, "Dispersion, abertation and deconvolution in multi-wavelength fluorescence images", J. Microsc., 182, pp. 50-60, 1996.

E.S. Meinel, "Origins of linear and nonlinear recursive restoration algorithms", J. Opt. Soc. Am. A, 3(6), pp. 787-799, 1986

A. Chomik, "Déconvolution 3D orientée vers la reconstruction d'objets biologiques observés en microscopie optique de fluorescence ", Thèse de l'Université de Haute-Alsace, 1997.

A.A. Hindenburg, J.E. Gervasoni, S. Krishna, "Intracellular distribution and pharmacokinetics of daunorubicin in anthracyclin-sensitive and -resistant HL-60 cells". *Cancer Res.*, 49, pp.4607-4614. 1989.

LL. Merlin, S. Marchal and C. Rammacci, "Influence of S9788, a new modulator of multidrug resistance: on the cellular accumalation and subcellular distribution of daunorubicin in P-glycoprotein-expressing MCF7 human breast adenocarcinoma cells", *Cytometry*, **20**, pp. 315-323, 1995.

D. Marquard and M.S. Center, " Drug transport mechanisms in HL60 cells isolated for resistance to adryamycin : ividence for nuclear drug accumulation and redistribution in resistant cells", *Cancer Res.*, 52, pp.3157-3163, 1992.

193

# Influence of SDZ-PSC833 on daunorubicin intracellular accumulation in bone marrow specimens from patients with acute myeloid leukaemia

JEAN-LOUIS MERLIN,<sup>1</sup> AGNÈS-PAULE GUERCI,<sup>2</sup> SOPHIE MARCHAL,<sup>1</sup> CORINNE BOUR,<sup>1</sup> PASCAL COLOSETTI,<sup>1,\*</sup> AGAPI KATAKI<sup>1</sup><sup>†</sup> AND OLIERO GUERCI<sup>2</sup> <sup>1</sup>Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, and <sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Service de Médecine Interne et des Maladies du Sang, Vandoeuvre-Les-Nancy, France

Received 21 April 1998; accepted for publication 24 July 1998

Summary. The multidrug resistance (MDR) modulating activity of SDZ-PSC833 (PSC), a non-immunosuppressive cyclosporine analogue. was investigated and compared with cyclosporin A (CSA) in bone marrow clinical specimens from 45 patients with acute myeloid leukaemia (AML) taken at diagnosis, using double-labelling flow cytometry with simultaneous determination of P-glycoprotein (PGP) expression and intracellular daunorubicin fluorescence (IDF). On the basis of pre-clinical results in multidrug-resistant K562 leukaemic cells, concentrations leading to iso-effective complete restoration of IDF were used: 5 and 10  $\mu$ mol/l, respectively for PSC and CSA.

In the clinical specimens. PGP expression was correlated with a significant decrease in IDF. PSC was found to be

Anthracyclines resistance is known to be multifactorial and includes resistance phenotype related to transmembrane or intracellular proteins such as P-glycoprotein (PGP) (Endicott & Ling, 1989), multidrug resistance-associated protein (MRP) (Grant *et al.* 1994), major vault lung resistance protein (LRP) (Scheper *et al.* 1993) as well as other mechanisms involving detoxification of oxidative molecular species by the glutathione system (Tew. 1994). Because of the importance of anthracycline-based chemotherapy in the treatment of leukaemias, clinical relevance of such resistance phenotypes inducing a decrease in cellular accumulation of anthracyclines has been studied (Kokenberg *et al.* 1988) and the expression of PGP (Kuwazuru *et al.* 1990:

\*Present address: INSERM U449. BP443, 91405 Orsay. France. †Present address: Hippocrate Hospital. Laboratory of Surgical Research, 114 Queen Sophia Avenue. 5L7 1527 Athens. Greece.

Correspondence: Dr Jean-Louis Merlin. Laboratoire de Recherche en Oncologie. Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne. 54511 Vandoeuvre-les-Nancy. France. significantly more potent than CSA since it was found to induce a significant increase in IDF in a higher number of cases and to a higher extent than CSA. PGP-unrelated activity of PSC was also observed in specimens expressing no PGP but exhibiting low IDF, thus probably expressing alternative resistance mechanisms. The results confirm the potency of PSC as MDR-modulating agent in clinical AML specimens whose resistance pattern differed from that of highly resistant cell models and suggest that the activity of PSC is not limited to P-glycoprotein inhibition.

Keywords: multidrug resistance. P-glycoprotein. acute myeloid leukaemia. daunorubicin. SDZ-PSC833.

Chevillard et al. 1997) or MDR1 gene expression (Marie et al. 1991: Pirker et al, 1992), MRP (Legrand et al. 1996) and LRP (Michieli et al. 1997) found to correlate with treatment outcome in acute myeloid leukaemias (AML). Implication of the glutathione system in clinical resistance to anthracyclines is still under debate (Tew. 1994), although it has been demonstrated in cellular models (Legrand et al. 1996). We recently reported that the determination of intracellular accumulation of daunorubicin in AML cells correlated with PGP expression and was a significant independent prognostic factor having the highest predictive value for clinical response (Guerci et al. 1995). Many compounds have been investigated for PGP modulation in experimental models (Tsuruo et al. 1983; Ford & Hait, 1990; Dantzig et al. 1996; Merlin et al, 1994). In most cases, and despite encouraging preclinical results, the development of MDR-modulating agents has been impaired because of clinical toxicity occurring when high doses were administered to achieve plasma concentrations inducing PGP inhibition (Terret et al. 1996). The non-immunosuppressive cyclosporine derivative

© 1998 Blackwell Science Ltd

SDZ-PSC833 (PSC) was proposed as a second-generation MDR modulator and proved efficient in several experimental models, *in vitro* and *in vivo* (Jachez *et al*, 1993; Keller *et al*, 1992; Jiang *et al*, 1995; Boesch *et al*, 1991; Ehrlich *et al*, 1997). PSC exhibited stronger PGP-inhibiting properties than its parent compound cyclosporin A (Demeule *et al*, 1997). New data were recently added showing its potential to modulate PGP related resistance in combination with anti-PGP monoclonal antibody (Watanabe *et al*, 1997). PSC has recently been used in clinical studies of AML (Kornblau *et al*, 1997) and myeloma (Sonneveld *et al*, 1996). An oral formulation of PSC has been investigated (Lush *et al*, 1997).

The mode of action of PSC is complex. Beside its PGP blocking activity (Demeule *et al*, 1997) inducing the restoral of the cellular accumulation of anthracycline (Hu *et al*, 1996), we recently found that this compound is able to modulate unidentified subcellular targets implicated in the cytoplasmic sequestration of daunorubicin (Bour *et al*, 1997).

The present study was designed to evaluate the potential reversing activity of the non-immunosuppressive cyclosporine derivative SDZ-PCS833 in human leukaemic cells from bone marrow aspirates as compared with that of its parent compound cyclosporin A.

#### MATERIAL AND METHODS

Clinical specimens. From November 1992 to May 1995, bone marrow specimens were collected from samples taken for routine cytology from 45 patients with AML at diagnosis. The specimens were layered onto Histopaque<sup>®</sup> (Sigma) and centrifuged at 1500 g for 10 min at 4°C. The leucocyte fractions were collected and resuspended in RPMI 1640 medium and proved to contain >85% atypical cells using May-Grünewald-Giemsa staining procedure.

## MDR Modulation by SDZ-PSC833 in AML 481

*Cell lines.* K562 human leukaemic cell line and its doxorubicin-selected subline K562-DXR were maintained in RPMI 1640 medium supplemented by 10% heat-inactivated fetal calf serum in a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. K562-DXR cells were maintained in  $2 \mu$ mol/l doxorubicin containing medium and was 165-fold resistant to daunorubicin (Merlin *et al.*, 1994).

*MDR-modulation assay.* Cyclosporin A (CSA) and SDZ-PSC833 (PSC) were obtained as generous gifts from Sandoz (presently Novartis) Pharma (Basel, Switzerland). Both compounds were solubilized in ethanol then diluted in sterile water to avoid the modulating activity of Cremophor EL commonly used as solubilizing agent for CSA (Ross *et al*, 1994).

The atypic cell population was selected by double lightscattering analysis (forward angle and right angle light scattering). Double-labelling flow cytometry analyses were carried out on cell suspensions containing  $10^6$  cells/ml using an Orthocyte<sup>®</sup> flow cytometer (Ortho Diagnostic Systems, Roissy, France) according to the methodology already reported (Merlin *et al*, 1994). Briefly, intracellular daunorubicin accumulation (IDF) was assayed, after incubating the cells with 2 µmol/l daunorubicin (Cerubidine<sup>®</sup>, Rhone Poulenc Rorer, Roger Bellon, Neuilly, France) for 2 h at 37°C. Modulators were incubated simultaneously with daunorubicin. Membrane-altered cells were identified by propidium iodide labelling and not further considered, as any membrane alteration could induce some defects in IDF which could be wrongly attributed to MDR phenotype.

PGP was detected using FITC-conjugated MRK16 monoclonal antibody (Immunotech, Marseilles, France). The limit of detection of PGP was 2.5% (limit of detection with a background noise/signal ratio of 2). Based upon our previous results (Guerci *et al*, 1995), the threshold for PGP expression was set to 10% and threshold for IDF was set to



Fig 1. Intracellular daunorubicin accumulation (IDA) in K562 human leukaemic cells. Control cells are sensitive cells (black histogram) and P-glycoprotein expressing are multidrug resistant cells (white histogram). Iso-effective complete reversal of resistance was achieved with SDZ-PSC833 (grey histogram) and cyclosporine A (hatched histogram) at concentrations of 5 and  $10 \,\mu$ mol/l respectively.

© 1998 Blackwell Science Ltd, British Journal of Haematology 103: 480-487

## 482 Jean-Louis Merlin et al

30 (channel number with reference to the cellular auto-fluorescence signal).

Modulation of IDF was considered as positive when a greater than 13% increase (four-channel variation) in daunorubicin fluorescence intensity was obtained, corresponding to the mean intra-experimental variation (data not

shown). Because of the limited cell number available in the clinical specimens, neither MRP nor LRP phenotyping was performed.

Each analysis was performed in triplicate on at least 5000 cells and the results expressed as mean values  $\pm$ standard deviations. Statistical analyses were performed using Chi-



Fig 2. Distribution of the clinical specimens according to intracellular daunorubicin fluorescence for P-glycoprotein-negative (A, B, C) and P-glycoprotein-positive specimens (D, E, F). The specimens were analysed for daunorubicin intracellular fluorescence using flow cytometry after being incubated with daunorubicin for 2 h without any modulator (A and D), or concomitantly exposed to  $10 \,\mu$ mol/l CSA (B and E) or  $5 \,\mu$ mol/l SDZ-PSC833 (C and F). The threshold values for P-glycoprotein expression positivity was 10%.

© 1998 Blackwell Science Ltd, British Journal of Haematology 103: 480-487

square and Student's unpaired t test, respectively, for qualitative distribution and quantitative analyses.

#### RESULTS

## K562 cell lines

As shown in Fig 1, an iso-effective complete restoration of daunorubicin cellular uptake was achieved with 5 µmol/l and 10 µmol/l for PSC and CSA respectively. At these concentrations both PSC and CSA induced a complete restoration of daunorubicin cytotoxicity in K562-DXR cells as compared to sensitive K562 cells using the MTT assay (data not shown). These concentrations were used throughout the study in clinical specimens.

> Table I. P-glycoprotein expression and daunorubicin accumulation status in the 45 clinical specimens. Thresholds for positivity are 10% for P-glycoprotein expression and 30 for daunorubicin median channel of red fluorescence. Fluorescence intensities were calibrated from the green (P-glycoprotein) and red (daunorubicin) autofluorescence signals measured in control unlabelled cell populations.

	Pgp <sup>-</sup>	$Pgp^+$
Dnr <sup>-</sup>	8 (18%)	21 (47%)
Dnr <sup>+</sup>	11 (24%)	5 (11%)

## Multidrug resistance phenotype in clinical specimens

PGP expression (Table I) was significantly detected in 26/45 specimens (58%). A significant difference in IDF (P < 0.02) was observed between PGP expressing (pgp<sup>+</sup>) and nonexpressing (pgp<sup>-</sup>) specimens (Fig 2) and were consistent



red fluorescence intensity (arbitrary unit)

#### MDR Modulation by SDZ-PSC833 in AML 483

Table II. Rate of positive modulations of intracellular daunorubicin accumulation (defined as increases in relative fluorescence signal >13%) achieved with SDZ-PSC833 (PSC) and cyclosporine A (CSA): P-glycoprotein (Pgp), intracellular daunorubicin accumulation status (Dnr) and biparametric specimen selection.

	PSC	CSA
Pgp <sup>-</sup>	8/19 (42%)	9/19 (47%)
Pgp <sup>+</sup>	20/26 (77%)	14/26 (54%)
Dnr <sup>-</sup>	23/29 (79%)	14/29 (48%)
Dnr <sup>+</sup>	5/16 (31%)	9/16 (56%)
Pgp <sup>-</sup> and Dnr <sup>+</sup>	3/11 (27%)	6/11 (54%)
Pgp <sup>+</sup> and Dnr <sup>-</sup>	16/21 (76%)	11/21 (52%)

with IDF values in most cases (71%), with a low IDF  $(dnr^{-})$ in  $pgp^+$  specimens (47%) and a high IDF (dnr<sup>+</sup>) in  $pgp^$ specimens (24%).

#### Modulation of daunorubicin accumulation in the clinical specimens

Positive modulations of daunorubicin accumulation were observed in 23 (51%) and 28 (62%) cases out of 45, respectively for CSA and PSC. An example is shown Fig 3.

P-glycoprotein specimen selection. No significant difference in the modulation rate (Table II) was observed for CSA between pgp<sup>+</sup> and pgp<sup>-</sup> specimens (54% and 47%, respectively) whereas PSC induced a higher modulation rate in pgp<sup>+</sup> specimens, 77% versus 42% in pgp<sup>-</sup> specimens. Thus the rate of PGP unrelated modulations induced by CSA and PSC in pgp<sup>-</sup> specimens were similar (42% and 47% respectively), whereas the modulation rate in pgp<sup>+</sup>

> Fig 3. Positive modulation of intracellular daunorubicin accumulation (IDF) by cyclosporin A (CSA) (hatched histogram) and SDZ-PSC833 (PSC) (black histogram) in Pglycoprotein expressing clinical specimen as compared to control untreated cells (white histogram). 25% of the cells expressed pgp as measured by immunolabelling by MRK16 monoclonal antibody. After linearization of the fluorescence data, the shifts in IDF were calculated as +43% and +16% for PSC and CSA, respectively.

<sup>© 1998</sup> Blackwell Science Ltd, British Journal of Haematology 103: 480-487

## 484 Jean-Louis Merlin et al

Table III. Quantitative modulation of intracellular daunorubicin accumulation achieved with  $5 \mu$ mol/l SDZ-PSC833 (PSC) and cyclosporine A (CSA): P-glycoprotein (Pgp), intracellular daunorubicin accumulation status (Dnr) and biparametric specimen selection. Results are expressed as mean values (SD). Statistical significance was evaluated using Student's *t* test with a significance limit set to P < 0.05.

	PSC	CSA
Pgp <sup>-</sup> Pgp <sup>+</sup>	$1 \cdot 10 \ (0 \cdot 12)$ $1 \cdot 21 \ (0 \cdot 14)$ $P < 0 \cdot 02$	$     \begin{array}{r}       1 \cdot 10 & (0 \cdot 14) \\       1 \cdot 08 & (0 \cdot 09) \\       P > 0 \cdot 05     \end{array} $
Dnr <sup>-</sup> Dnr <sup>+</sup>	$1 \cdot 19 \ (0 \cdot 13)$ $1 \cdot 10 \ (0 \cdot 15)$ $P < 0 \cdot 05$	1.08 (0.09) 1.10 (0.15) P > 0.05
Pgp <sup>-</sup> and Dnr <sup>+</sup> Pgp <sup>+</sup> and Dnr <sup>-</sup>	1.05 (0.08) 1.19 (0.13) P<0.002	1.11 (0.17) 1.08 (0.10) P > 0.05

specimens was higher for PSC than for CSA (77% and 54%, respectively). Qualitatively, no significant difference appeared between PSC and CSA (P > 0.05).

Quantitatively (Table III), only PSC induced an increase in IDF in pgp<sup>+</sup> specimens (+21%). A significant difference (P < 0.02) was observed between the mean increase in IDF induced by PSC in pgp<sup>+</sup> (+21%, n = 26) and in pgp<sup>-</sup> specimens (+10%, n = 19). No significant difference was observed with CSA in the same conditions (+8%, n = 26 and +10%, n = 19, respectively for pgp<sup>+</sup> and pgp<sup>-</sup> specimens).

Intracellular daunorubicin accumulation specimen selection. Qualitatively (Table II), no significant difference in the modulation rate was observed between  $dnr^-$  and  $dnr^+$  specimens for CSA (48% and 56%, respectively), whereas PSC induced a higher modulation rate in  $dnr^-$  specimens (79%) than in  $dnr^+$  specimens (31%). A significantly higher modulation rate was observed with PSC (79%) than with CSA (48%) in the  $dnr^-$  specimens. In addition, the rate of IDF-unrelated modulations in the  $dnr^+$  specimens was lower with PSC (31%) than with CSA (56%).

Quantitatively (Table III), as already observed with pgp selection, only PSC induced an increase of IDF in dnr<sup>-</sup> specimens (+19%). The mean increase in IDF induced by PSC was significantly higher (P < 0.05) in dnr<sup>-</sup> (+19%, n = 29) than in dnr<sup>+</sup> specimens (+10%, n = 16), whereas no difference was observed with CSA. In dnr<sup>-</sup> specimens the increase in IDF induced by PSC (+19%) was significantly higher (P < 0.01) than with CSA (+8%).

Biparametric specimen selection. When PGP expression and IDF status were combined and the population separated into 'sensitive' pgp<sup>-</sup> dnr<sup>+</sup> (n = 11) and 'resistant' pgp<sup>+</sup> dnr<sup>-</sup> (n = 21) specimens, no major modification of the results was observed from the results achieved with IDF alone.

In the modulation rate analysis (Table II), no difference was found with CSA between sensitive and resistant specimens (54% and 52%, respectively), whereas, with PSC, a

higher modulation rate was observed in resistant than in sensitive specimens (76% and 27%, respectively).

Quantitatively (Table III), the results confirmed those achieved with mono-parametric (pgp expression or dnr accumulation) specimens selection, with only PSC inducing a significant increase in IDF. No significant difference was found with CSA with +11% and +8% increase in IDF, respectively for sensitive and resistant specimens, whereas PSC induced a significantly (P < 0.002) higher increase in IDF in the resistant specimens ( $+19\% \nu + 5\%$ , in the sensitive specimens).

#### DISCUSSION

Although the clinical relevance of MDR phenotyping in solid tumours is still under debate, its prognostic interest in haematological malignancies, especially in AML, has been established (Kuwazuru et al, 1990; Campos et al, 1992; Marie et al, 1991; Pirker et al, 1992; Guerci et al, 1995; List, 1996). MDR phenotype represents an independent predictive factor for clinical response of patients receiving anthracycline-based chemotherapy. The techniques used are based upon the determination of PGP expression (Kuwazuru et al, 1990; Campos et al, 1992) or mdr1 gene expression (Marie et al, 1991; Pirker et al, 1992). We previously reported (Guerci et al, 1995; Merlin et al, 1994) that doublelabelling flow cytometry enables the simultaneous determination of PGP expression and its functionality through IDF. This analytical procedure was validated in demonstrating that IDF correlated with tritiated daunorubicin intracellular accumulation (Merlin et al, 1994) and was used to investigate the modulating activity of second-generation MDR modulators such as S9788 (Merlin et al, 1994, 1995a) and tiapamil analogues (Abderrabi et al, 1996), as well as non-chemical modulation by liposome-encapsulated daunorubicin (Merlin et al, 1995b). This technique was recently validated through a multicentric assay in a leukaemic cell line (Marie et al, 1997).

In the present study, PGP expression was detected in approximately half of the specimens, thus confirming our previous data (Merlin *et al*, 1994) and those reported by other groups (Kuwazuru *et al*, 1990; Campos *et al*, 1992; Michieli *et al*, 1997) with 46-71% PGP expressing specimens. In addition, the correlation between PGP expression and its functional consequence, i.e. decrease in intracellular daunorubicin accumulation, was confirmed in most cases (71%). Discrepancies suggest either non-PGP-mediated decrease in IDF (18%) or expression of non-functional PGP (11%).

MDR modulation protocols using CSA have been evaluated in clinical studies in patients with acute leukaemias (List *et al*, 1993; Fani *et al*, 1994). The clinical development of CSA as a MDR modulating agent was dramatically impaired because of the occurrence of toxic side-effects, which were mainly hepatic (Fani *et al*, 1994). This justified the development of PSC as second-generation cyclosporinederived MDR modulators aiming at a better activity/safety.

Although PSC activity has been extensively evaluated in cell models (Jachez et al. 1993; Keller et al. 1992; Jiang et al.

© 1998 Blackwell Science Ltd, British Journal of Haematology 103: 480-487

1995; Boesch et al, 1991; Ehrlich et al, 1997), no study has, to our knowledge, been carried out in clinical AML specimens. When this study was initiated, no PSC pharmacokinetic data was available and therefore we selected the concentration to be tested in clinical specimens from in vitro studies of cell lines which expressed PGP. Recent data published from phase I clinical studies evaluating PSC combined with etoposide reported that using daily 2 h intravenous infusions for 5 consecutive days at the maximal tolerated dose (10 mg/kg), the plasma concentration of  $2 \cdot 5 3 \mu mol/l$  could be achieved (Boote et al, 1996). New data from the clinical evaluation of oral formulation of PSC showed that a peak plasma concentration of up to  $4 \mu mol/l$ can be reached (unpublished observation). So, the PSC concentration tested in the present study (5  $\mu mol/l)$  could be considered to be moderately suprapharmacologic.

Differing from our previous study with S9788 (Merlin *et al.*, 1994), we used 10% of cell labelling as cut-off value for PGP expression since this value was found discriminant for the prediction of clinical outcome (Guerci *et al.*, 1995). Considering this cut-off value, the activity of PSC, as well as that of CSA, did not appear to depend strictly on PGP expression, since significant increases in daunorubicin accumulation were observed in pgp<sup>-</sup> samples. This was consistent with the results previously obtained with CSA (Merlin *et al.*, 1994) when pgp expression was considered as significant from 2% cell labelling (limit of detection).

The difference in IDF measured in pgp<sup>+</sup> and pgp<sup>-</sup> clinical specimens (pgp<sup>+</sup>/pgp<sup>-</sup> =  $0.84 \pm 0.22$ ) was significantly lower (P < 0.05) than IDF measured in the K562 doxorubicin-selected cell line as compared with the parental sensitive line ( $0.37 \pm 0.06$ ) used in our previous experiments (Merlin *et al*, 1994). Therefore the resistance pattern observed in clinical specimens must differ from that of drug-selected cell lines and probably involve multiple mechanisms generated in response to multifactorial stress encountered by the patient.

Non-specific modulations, considered as positive modulation in  $pgp^-$  and  $dnr^+$  specimens, were observed with both PSC and CSA but could be considered as artefactual since they were quantitatively limited. These data were consistent with those previously reported, using CSA (Merlin *et al*, 1994). The results achieved with both parameters (PGP and dnr) were consistent and further confirmed the reliability of IDF as a resistance marker in clinical leukaemic specimens.

In pgp<sup>+</sup> specimens, our results showing that PSC modulated IDF in more cases and to a higher extent than CSA confirmed the high potency of PSC (Jachez *et al*, 1993; Jiang *et al*, 1995). Moreover, the mean quantitative increase in IDF induced by PSC in pgp<sup>+</sup> (21%) and dnr<sup>-</sup> (19%) specimens exceeded the difference (-16%) observed between pgp<sup>+</sup> and pgp<sup>-</sup> specimens and thus, referring to our previous study (Guerci *et al*, 1995), correlated with clinical response prediction.

PSC failed to modulate IDF in approximately 20% pgp<sup>+</sup> and dnr<sup>-</sup> specimens as compared with approximately 50% for CSA, thus indicating a higher potency of PSC. The higher activity of PSC could be further explained by the fact that in addition to its modulation of PGP, PSC can modulate

© 1998 Blackwell Science Ltd, British Journal of Haematology 103: 480-487

the subcellular distribution of daunorubicin (Bour et al, 1997).

Thus, multifactorial resistance patterns that are likely to appear in clinical specimens should justify the combination of modulating agents acting on different cellular targets. Such experiments have already been reported in cell models, yielding encouraging results (Hwang *et al.* 1996; Bennis *et al.* 1995). As far as PSC is concerned, preliminary results demonstrated synergistic modulation when combined with S9788 in multidrug resistant MCF7 cells (Merlin *et al.* 1996).

The present results achieved in clinical specimens expressing PGP confirmed the potential usefulness of PSC in circumventing MDR in haematological malignancies and could be useful in the analysis of ongoing clinical trials. Because PSC seems to be active on different cellular target, multiparametric evaluation of resistance markers in acute leukaemias, including MRP and LRP, would be interesting. With this aim, a standardized RT-PCR technology would be recommended to minimize the bone marrow sampling. In such a way, multicentric evaluation of mdr1 gene expression (Chevillard *et al*, 1997) has been performed in leukaemia specimens and the validation of mrp gene expression analysis is under progress.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the French Ligue Nationale contre le Cancer, Comité de Meurthe et Moselle, the Pôle Européen de Santé, Région Lorraine, Communauté Urbaine du Grand Nancy and Alexis Vautrin Cancer Centre private research funds.

The authors are grateful to Dr P. Rigaudy and Dr A. Covelli, Novartis Pharma, Basel (Switzerland), and Dr D. Cohen, Novartis Pharma, East Hanover, N.J. (U.S.A.), for helpful comments, to N. Missoum for technical assistance and to Dr J. C. Humbert (Haematology Department, CHU Nancy) for the cytological analyses.

#### REFERENCES

- Abderrabi, M., Marchal, S. & Merlin, J.L. (1996) Comparative in vitro evaluation of dithiane analogs of tipamil. Ro 11-2933, Ro 44-5911 and Ro 44-5912 as multidrug resistance modulators. *Anti-Cancer Drugs*, 7, 430–436.
- Bennis, S., Ichas, F. & Robert, J. (1995) Differential effects of verapamil and quinine on the reversal of doxorubicin resistance in a human leukemia cell line. *International Journal of Cancer*, 62, 283–290.
- Boesch, D., Gaveriaux, C., Jachez, B., Pourtier-Manzanedo, A., Bollinger, P. & Loor, F. (1991) In vivo circumvention of P-glycoprotein mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC833. Cancer Research, 51, 4226–4233.
- Boote, D.J., Dennis, P.R., Twentyman, P.R., Osborne, R.J., Laburte, C., Hensel, S., Smyth, J.F., Brampton, M.H. & Bleehen, N.M. (1996) Phase I study of etoposide with SDZ PSC833 as a modulator of multidrug resistance in patients with cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 14, 610–618.
- Bour, C., Gramain, M.P. & Merlin, J.L. (1997) Modulation of daunorubicin subcellular distribution in multidrug resistant

## 486 Jean-Louis Merlin et al

MCF-7 cells by SDZ-PSC833. Proceedings of the American Association of Cancer Research, 38, 553.

- Campos, L., Guyotat, D., Archimbaud, E., Calchmard-Ohiol, P., Tsuruo, T., Troncy, J., Treille, D. & Fiere, D. (1992) Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute non-lymphoblastic leukemia cell at diagnosis. *Blood*, 79, 473–476.
- Chevilard, S., Vielh, P., Marie, J.P., Faussat, A.M., Barbu, V., Bayle, C., Bonnal, C., Boutonnat, J., Calvo, F., Charrier, J., Clary, A., Colosetti, P., Danel-Moore, L., Decrémoux, P., Delvincourt, C., Finat-Duclos, F., Genne, P., Kataki, A., Kouyoumdjian, J.C., Lacave, R., Maugard, C., Merlin, J.L., Mousseau, M., Pinguet, F., Quillien, V., Raphael, M., Richard, B., Verrelle, P. & Robert, J. (1997) French multicentric evaluation of mdr1 gene expression by RT-PCR in leukemia and solid tumours: standardization of RT-PCR and preliminary comparisons between RT-PCR and immunohistochemistry in solid tumours. *Leukemia*, 11, 1095–1106.
- Dantzig, A.H., Shepard, R.L., Cao, J., Law, L., Ehlhardt, W.J., Baughman, T.M., Bumol, T.F. & Starling, J.J. (1996) Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug-resistance by a potent cyclopropyl-dibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Research*, 56, 4171-4179.
- Demeule, M., Wenger, R.M. & Beliveau, R. (1997) Molecular interactions of cyclosporin A with P-glycoprotein: photolabeling with cyclosporin derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 6647–6652.
- Ehrlich, P.H., Moustafa, Z.A., Archinal-Mattheis, A.E., Newman, M.J. & Cohen, D. (1997) The reversal of multidrug resistance in multicellular spheroids by SDZ PSC833. *Anticancer Research*, 17, 129–133.
- Endicott, J.A. & Ling, V. (1989) The biochemistry of P-glycoproteinmediated multidrug resistance. Annual Review of Biochemistry, 58, 137–171.
- Fani, R., Damiani, D., Cerno, M., Candoni, A., Baraldo, M., Russo, D. & Baccarini, M. (1994) Treatment of acute myeloid leukemia with cyclosporin A plus chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs*, 5, 51.
- Ford, J.M. & Hait, W.N. (1990) Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacology Reviews*, 42, 155– 199.
- Gonzales, O., Colombo, T., De Fusco, M., Imperatori, L., Zuchetti, M. & D'Incalci, M. (1995) Changes in doxorubicin distribution in mice pretreated with the cyclosporin analogue SDZ-PSC833. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 36, 335–340.
- Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Cole, S.P.C. & Deeley, R.G. (1994) Overexpression of multidrug resistance associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Research*, 54, 357–361.
- Guerci, A., Merlin, J.L., Missoum, N., Feldman, L., Marchal, S., Witz, F., Rose, C. & Guerci, O. (1995) Predictive value for treatment outcome in acute myeloid leukemia of cellular daunorubicin and P-glyco-protein expression simultaneously determined by flow cytometry. Blood, 85, 2147–2153.
- Hu, Y.P., Chapey, C. & Robert, J. (1996) Relationship between the inhibition of azidopine binding to P-glycoprotein by MDRmodulators and their efficiency in restoring doxorubicin intracellular accumulation. *Cancer Letters*, 109, 203–209.
- Hwang, M., Ahn, C.H., Pine, S., Yin, J.J., Hrycyna, C.A., Licht, T. & Aszalos, A. (1996) Effect of combination of suboptimal concentrations of P-glycoprotein blockers on the proliferation of mdr1 gene expressing cells. *International Journal of Cancer*, 65, 389–397.
- Jachez, B., Nordman, R. & Loor, F. (1993) Restoration of taxol sensitivity of multi-drug resistant cells by the cyclosporine SDZ-PSC833 and the cyclopeptide SDZ280-446. *Journal of the National Cancer Institute*, 85, 478–483.

- Jiang, X.R., Kelsey, S.M., Wu, Y.L. & Newland, A.C. (1995) Circumvention of P-glycoprotein-mediated drug resistance in human leukaemic cells by non-immunosuppressive cyclosporin D analogue, SDZ PSC833. British Journal of Haematology, 90, 375– 383.
- Keller, R.P., Altermatt, H.J., Nooter, K., Poschmann, G., Laissue, J.A., Bollinger, P. & Hiestand, C. (1992) SDZ PSC833, a nonimmunosuppressive cyclosporine: its potency in overcoming P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of murine leukemia. International Journal of Cancer, 50, 593-597.
- Kokenberg, E., Sonneveld, P., Sizoo, W., Hagenberg, A. & Löwenberg, B. (1988) Cellular pharmacokinetics of daunorubicin: relationships with the response to treatments in patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 6, 802.
- Kornblau, S.M., Estey, E., Madden, T., Tran, H.T., Zhao, S., Consoli, U., Snell, V., Sanchez-Williams, G., Kantarjian, H., Keating, M., Newman, R.A. & Andreeff, M. (1997) Phase I study of mitoxantrone plus etoposide with multidrug blockage by SDZ PSC-833 in relapsed or refractory acute myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 1796–1802.
- Kuwazuru, Y., Yoshimura, A., Hanada, S., Utsunomiya, A., Makino, T., Ishibashi, K., Kodoma, M., Iwashi, M., Arino, T. & Akiyama, S.I. (1990) Expression of multidrug transporter P-glycoprotein in acute leukemia cells and correlation to clinical resistance. *Cancer*, 66, 868–873.
- Legrand, D., Perrot, J.Y., Tang, R.P., Simonin, G., Gurbuxani, S., Zittoun, R. & Marie, J.P. (1996) Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) mRNA and protein in normal peripheral blood and bone marrow haemopoietic cells. *British Journal of Haematology*, 94, 23–33.
- List, A.F. (1996) Role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 10, 937– 942.
- List, A.F., Spier, C., Greer, J., Wolf, S., Hutter, J., Dorr, R., Salmon, S., Futscher, B., Baier, M. & Dalton, W. (1993) Phase I/II trial cyclosporine as chemotherapy-resistance modifier in acute leukaemia. *Journal of Clinical Oncology*, 11, 1652–1660.
- Lush, R.M., Meadows, B., Fojo, A.T., Kalafsky, G., Smith, H.T., Bates. S. & Figgs, W.D. (1997) Initial pharmacokinetics and bioavailability of PSC833, a new P-glycoprotein antagonist. *Journal of Clinical Pharmacology*, 37, 123–128.
- Marie, J.P., Huet, S., Faussat, A.M., Perrot, J.Y., Chevilard, S., Barbu, V., Bayle, C., Boutonnat, J., Calvo, F., Campos-Guyotat, L., Colosetti, P., Cazin, J.L., Decrémoux, P., Delvincourt, C., Demur, C., Drenou, B., Fenneteau, O., Feuillard, J., Garnier-Suillerot, A., Genne, P., Gorisse, M.C., Gosselin, P., Jouault, H., Lacave, R., LeCalvez, G., Leglise, M.C., Leonce, S., Manfait, M., Maynadie, M., Merle-Beral, H., Merlin, J.L., Mousseau, M., Morjani, H., Picard, F., Pinguet, F., Poncelet, P., Racadot, E., Raphael, M., Richard, B., Rossi, J.F., Schlegel, N., Vielh, P., Zhou, D. & Robert, J. (1997) Multicentric evaluation of the MDR phenotype in leukemia. Leukemia, 11, 1086–1094.
- Marie, J.P., Zittoun, R. & Sikic, B.L. (1991) Multidrug resistance (MDR1) gene expression in adult acute leukemias: correlation with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood*, 78, 586–592.
- Merlin, J.L., Guerci, A., Marchal, S., Missoum, N., Ramacci, C., Humbert, J.C., Tsuruo, T. & Guerci, O. (1994) Comparative evaluation of S9788, verapamil. cyclosporine A in K562 human cell lines and in P-glycoprotein-expressing samples from patients with hematologic malignancies. *Blood*, 84, 262–269.
- Merlin, J.L., Marchal, S., Ramacci, C., Dieterlen, A., Schultz, G., Lucas, C., Poullain, M.G. & Berlion, M. (1995a) Influence of S9788, a new modulator of multidrug resistance, on the

© 1998 Blackwell Science Ltd, British Journal of Haematology 103: 480-487

cellular accumulation and subcellular distribution of daunorubicin in P-glycoprotein expressing MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. *Cytometry*, **20**, 315–323.

- Merlin, J.L., Marchal, S., Ramacci, C., Notter, D. & Vigneron, C. (1995b) Modulation of daunorubicin intracellular accumulation in P-glycoprotein expressing MCF-7 human breast adenocarcinoma cells by thermosensitive-liposome encapsulation and hyperthermia. International Journal of Hyperthermia, 11, 855–865.
- Merlin, J.L., Wihlidal, A., Kataki, A., Ramacci, C., Marchal, S. & Poullain, M.G. (1996) Synergistic modulation of multidrug resistance by associations of modulators with different mode of action. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 37, 316 (abs. 2149).
- Michieli, M., Damiani, D., Ermacora, A., Raspadori, D., Michelutti, A., Grimaz, S., Fanin, R., Russo, D., Lauria, F., Masolini, P. & Baccarini, M. (1997) P-glycoprotein (PGP) and lung-resistance protein (LRP) expression and function in leukaemic blast cells. *British Journal of Haematology*, 96, 356–365.
- Pirker, R., Wallner, J., Gotzl, M., Gsur, A., Geissler, K., Havelec, L., Knapp, W., Haas, O., Lnkesh, W. & Lechner, A. (1992) MDR1 RNA is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Blood*, 79, 557–559.
- Ross, D.D., Wooten, P.J., Tong, Y., Cornblatt, B., Levy, C., Sridara, R., Lee, J. & Schiffer, C.A. (1994) Synergistic reversal of multidrugresistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by cyclosporin A and cremophor EL. *Blood.* 83, 1337.
- Scheper, R.J., Broxterman, J.H., Scheffer, G.L., Kaaijk, P., Dalton, W.S., Van Heijningen, T.H.M., Van Kalken, C.K., Slovak, M.L.,

## MDR Modulation by SDZ-PSC833 in AML 487

De Vries, E.G.E., Van der Valk, P. Meijer, C.J.L.M. & Pinedo, H.M. (1993) Overexpression of a  $M_r$  110.000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Research*, **53**, 1475–1478.

- Sonneveld, P., Marie, J.P., Huisman, C., Vekhoff, A., Schoester, M., Faussat, A.M., Van Kapel, J., Groenewegen, A., Charnick, S., Zittoun, R. & Lowenberg, B. (1996) Reversal of multidrug resistance by SDZ PSC833 combined with VAD (vincristine. doxorubicin. dexamethasone) in refractory multiple myeloma: a phase I study. *Leukemia*. 10. 1741–1750.
- Terret, C., Le Cesne, A., Lagarde, N., Di Palma, M., Goncalves, E., N'Dom, P., Yataghene, Y., Funck-Brentano, C., N'Guyen, J.P., Marino, J.P., Besse, B., Armand, J.P., Le Chevalier, T., Belpomme, D., Misset, J.L., D'Agay, L., Berger, E., Sarkany, M. & Giroux, B. (1996) S9788 a multidrug resistance (MDR) reversing agent: French phase I studies with a 6-hour continuous infusion schedule in combination with chemotherapy in patients with refractory cancer. Proceedings of the American Association for Cancer Research, 37, 165.
- Tew. K.T. (1994) Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Research.* 54, 4313.
- Tsuruo, T., Illida, H., Nojri, M., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. (1983) Circumvention of vincristine and adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. *Cancer Research*, 43, 2905–2910.
- Watanabe, T., Naito, M., Kokubu, N. & Tsuruo, T. (1997) Regression of established tumors expressing P-glycoprotein by combinations of adriamycin. cyclosporin derivatives and MRK-16 antibodies. *Journal of the National Cancer Institute*, 89, 512–518.

# **PUBLICATIONS - COMMUNICATIONS**

Publications dans des revues internationales à comité de lecture	5
Contributions à des ouvrages à comité de lecture	2
Communications	1

## PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE

P1 - Merlin JL, Guerci AP, Marchal S, <u>Bour C</u>, Colosetti P, Kataki A, Lederlin P Influence of SDZ-PSC833 on daunorubicin intracellular accumulation in P-glycoprotein expressing bone marrow specimens from patients with acute myeloid leukemia. Br J Haematol, 103, 480-487, 1998

P2 - Bachmann N, Barberi-Heyob M, <u>Bour C</u>, Parache R-M, Guillemin F, Batt A-M, Merlin JL Intracellular distribution of tamoxifen in resistant human breast adenocarcinoma cells using tamoxifen-eosin association Cell Biol Toxicol, 14, 429-435, 1998

P3 - Melnikova V, Bezdetnaya L, <u>Bour C</u>, Festor E, Gramain MP, Merlin JL, Potapenko A, Guillemin F.
Subcellular localization of meta-tetra(hydroxyphenyl) chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment
J Photochem Photobiol B: Biol, 49, 96-103, 1999

P4 - <u>Bour-Dill C</u>, Gramain MP, Merlin JL, Marchal S, Guillemin F Determination of intracellular organelles implied in daunorubicin cytoplasmic sequestration in pglycoprotein expressing MCF7 cells using fluorescence microscopy image analysis Cytometry, 39, (1),16-25, 2000

P5 - Merlin JL, <u>Bour-Dill C</u>, Marchal S, Ramacci C, Poullain MG, Giroux B Modulation of daunorubicin cellular resistance by combination of P-glycoprotein blockers acting on drug efflux and intracellular drug sequestration in Golgi vesicles. Cytometry, 41,62-72, 2000

P6 - Merlin J. L, <u>Bour-Dill C</u>, Marchal, S, Bastien L, Gramain M-P Resistance to paclitaxelinduces time delayed multinucleation and DNA fragmentation into large fragmentsin MCF-7 human breastadenocarcinomacells. AnticancerDrugs, 11, (4), 195-302.

# CONTRIBUTIONS A DES OUVRAGES A COMITE DE LECTURE

C2 - Gramain MP, <u>Bour C</u>, Chomik A, Dieterlen A, Haeberlé O, Meyer JJ, Marchal S, Merlin JL, Guillemin F

Fluorescence microscopy image deconvolution : application to anthracycline distribution in breast cancer cells

in Optical biopsies and microscopic techniques II, IJ Bigio, H Schneckenburger, J Slavik, K Svanberg, PM Viallet, Eds, Proc SPIE, 3197, 187-193, 1997

C1 - Bachmann N, Barberi-Heyob M, Gramain MP, <u>Bour C</u>, Marchal C, Parache RM, Guillemin F, Merlin JL

Evaluation of intracellular tamoxifen-induced fluorescence in tamoxifen-resistant human breast adenocarcinoma cells

in Optical biopsies and microscopic techniques II, IJ Bigio, H Schneckenburger, J Slavik, K Svanberg, PM Viallet, Eds, Proc SPIE, 3197, 308-312, 1997

# COMMUNICATIONS

1 - Bour C, Gramain MP, Colosetti P, Ramacci C, Marchal S, Merlin JL

Resistance aux anthracyclines : localisation subcellulaire de la daunorubicine par microscopie de fluorescence et analyse d'images

IXe Colloque International de Pont-à-Mousson - Eurobiologie, Pont-à-Mousson, 29 septembre-3 octobre 1996

Med Sci, 12, 82, abstr L164, 1996

2 - Bour C, Gramain MP, Merlin JL

Modulation of daunorubicin subcellular distribution in multidrug resistant MCF7 cells by SDZ-PSC833

88th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego (USA), 12-16 avril 1997

Proc Am Assoc Cancer Res, 38, 593, 1997

3 - Bachmann N, Barberi-Heyob M, Gramain MP, <u>Bour C</u>, Marchal S, Parache RM, Guillemin F, Merlin JL

Evaluation of intracellular tamoxifen-induced fluorescence in tamoxifen-resistant human breast adenocarcinoma cells.

BiOS Europe'97, San Remo (Italie), 4-8 septembre 1997

4 - Gramain MP, <u>Bour C</u>, Chomik A, Dieterlen A, Guillemin F, Merlin JL Fluorescence microscopy image deconvolution, application to anthracycline resistance in breast

cancer cells.

BiOS Europe'97, San Remo (Italie), 4-8 septembre 1997

5 - Merlin JL, Guerci AP, Marchal S, <u>Bour C</u>, Colosetti P, Kataki A, Guerci O Influence of SDZ-PSC833 on daunorubicin intracellular accumulation in bone marrow specimens from patients with acute myeloid leukemia.

EORTC Pharmacology and Molecular Mechanisms Group, Preclinical Therapeutic Models Group, Screening and Pharmacology Group Winter Meeting, Nancy, France, 21-24 Janvier 1998

6 - <u>Bour C</u>, Gramain MP, Marchal S, Bonhomme C, Guillemin F, Merlin JL Cellular pharmacokinetics of idarubicin in sensitive and resistant carcinoma cell lines. EORTC Pharmacology and Molecular Mechanisms Group, Preclinical Therapeutic Models Group, Screening and Pharmacology Group Winter Meeting, Nancy, France, 21-24 Janvier 1998

7 - Merlin JL, Guerci AP, Marchal S, <u>Bour C</u>, Colosetti P, Kataki A, Guerci O. Modulation of daunorubicin intracellular accumulation by SDZ-PSC833 in acute myeloid leukemia clinical specimens.

3rd International symposium on Drug Resistance in leukemia and lymphoma, Amsterdam, 4-7 mars 1998

Leukemia, 1998, 12, 273

8 - Merlin JL, Guerci AP, Marchal S, <u>Bour C</u>, Colosetti P, Kataki A, Guerci O.
SDZ-PSC833 modulation of daunorubicin intracellular accumulation in cells from patients with acute myeloid leukemias.
89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, New Orleans (USA), 28 mars - 1 avril 1998
Proc Am Assoc Cancer Res, 39, 214, 1998

9 - <u>Bour C</u>, Gramain MP, Bonhomme C, Guillemin F, Merlin JL Pharmacocinétique cellulaire et moléculaire de l'idarubicine dans des lignées cellulaires résistantes issues de carcinome 18e Forum de Cancérologie, Paris, 2-4 juin 1998

Bull Cancer, 85, 404, 1998

10 - <u>Bour C</u>, Marchal S, Oudot A, Gramain MP, Barberi-Heyob M, Solis-Recendes MG, Bastian G, Merlin JL

Effet de l'altération de la distribution intracellulaire de l'épirubicine et de l'idarubicine sur l'induction d'apoptose

7e Journées du GPCO, Arcachon, 22-23 octobre 1998

11 - Bour C, Merlin JL, Gramain MP, Marchal S, Ramacci C, Solis Recendes MG, Bastian G, Guillemin F. Cellular pharmacokinetics of idarubicin using fluorescence microscopy as resistance marker for apoptosis induction in breast and lung cancer cell lines.
90th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Philadelphia (USA), 10-14 avril 1999
Proc Am Assoc Cancer Res, 40, 404, 1999

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Structure chimique des anthracyclines d'après Prat et al. (Prat et al., 1994).
- Figure 2: Mécanisme d'inhibition de la topoisomérase II d'après Isaacs et al.
- Figure 3: Production de radicaux hydroxyles (.OH) dépendante du Fe pour la doxorubicine. GSH, glutathion et GSSG, glutathion réduit (Prat et al., 1994).
- Figure 4: B et C) molécules de signalisation cellulaire intracellulaire importante; B) formation de 2 IP<sub>3</sub> et DG par hydrolyse de PiP<sub>2</sub>; C) sphingomyéline (sphingophospholipides) (Albert et al., 1995).

Figure 5: Voies de synthèse ( ) et de sauvegarde du glutathion ( ) d'après Tew et al.

- Figure 6: Représentation schématique des éléments de régulation de mdr1. Le promoteur inclut entre autres la séquence CCAAT, les séquences de la protéine activatrice 1 (AP-1) et des éléments répondants à l'-AMP-c (CRE). Les éléments de contrôle au niveau de l'exon1 comprennent la séquence Y-box ainsi que de l'AP-2 et de SP1 (Rohlff and Glazer, 1995).
- Figure 7: Modèle de structure de la P-gp et de son orientation à travers la membrane cytoplasmique d'après Gottesman et al (Gottesman, 1993).
- Figure 8: Deux modèles de structure de la MRP et de son orientation à travers la membrane cytoplasmique issues de la revue de *Loe et al.* (Loe et al., 1996).
- Figure 9: Les différentes étapes de contrôles au cours du cycle cellulaire selon le site internet http://www.baclesse.fr/cours/fondamentale/4-division-cellulaire/Divis-1.htm.
- Figure 10: Aspects morphologiques de l'apoptose d'après Kerr et al.
- Figure 11: Schéma récapitulatif des processus cellulaires probables mis en œuvre après un traitement par anthracyclines: A) Signalisation et régulation de l'expression génique, B) arrêts du cycle et mort cellulaire
- Figure 12: Scénario d'induction de l'apoptose par la doxorubicine dans des cellules de neuroblastome d'après *Fulda et al.*
- Figure 13: Schéma du poste de microscopie de fluorescence (Gramain, 2000).
- Figure 14: Principe de la convolution d'une scène d'origine f par la réponse impulsionnelle optique du système h qui aboutit à une image g bruitée n (Gramain, 2000).
- Figure 15: Comparaison des produits d'amplification sur un même gel de migration et pour les mêmes ADNc (p53/gapdh) obtenus pour différents nombres de cycles d'amplification en PCR "classique" et "Touch down"
- Figure 16: Evaluation comparative de la cinétique d'incorporation de la DNR à 2 μM pour la lignée MCF-7 par analyse semi-quantitative: soit par analyse d'images avant et après déconvolution (densités moyennes rapportées à la valeur obtenue après 15 min. d'incorporation), soit par cytométrie ne flux (intensités de fluorescence médianes rapportées à la valeur obtenue après 15 min. d'incorporation) (Gramain et al., 1997).
- Figure 17: Evolution de la distribution intracellulaire de la daunorubicine à 2μM pour la lignée MCF-7, aux temps d'incubation suivants: a) 15 min, b) 60 min, c) 180 min. Les images a'), b'), and c') illustrent les résultats obtenus après déconvolution des images a), b), and c) par l'algorithme du MAP après 10 itérations (Gramain et al., 1997).

- Figure 18: Comparaison de spectres d'émission de fluorescence obtenus dans de l'eau pour la DNR, l'EPI et l'IDA déterminés à une concentration de 20 μM: A), spectres brutes (Unité Arbitraire); B) spectres normalisés (ρ).
- Figure 19: Spectres normalisés de fluorescence de la DNR à 20 μM obtenus au niveau du compartiment golgien pour les lignées MCF-7 et MCF-7<sup>DXR</sup>. Le ratio de fluorescence (ρ) correspond à la normalisation des intensités de fluorescence par rapport à l'intensité du pic de fluorescence de la DNR.(594 nm): A) Spectres après 2 h d'incubation; B) Spectres après 24 h d'incubation.
- Figure 20: Spectres normalisés de fluorescence de la DNR ,après 2 h d'incubation à 20 μM, obtenus au niveau de différentes régions intracellulaires d'intérêt pour les lignées MCF-7 (A) et MCF-7<sup>DXR</sup> (B). Le ratio de fluorescence (ρ) correspond à la normalisation des intensités de fluorescence par rapport à l'intensité du pic de fluorescence de la DNR (594 nm).
- Figure 21: Caractérisation morphologique d'un échantillon issu d'un prélèvement de LAM d'adulte par marquage des organites intracellulaires : l'appareil de Golgi (Golgi) avec le NBD-C<sub>6</sub>-céramide a), image en fond clair correspondante b); le réticulum-endoplasmique (RE) avec le DiOC<sub>6</sub> c), image en fond clair correspondante d);le noyau et les lysosomes avec l'acridine-orange : lysosomes e), image en fond clair correspondante f); noyau g), image en fond clair correspondante h).
- Figure 22: Illustration de la distribution intracellulaire de la fluorescence de la DNR pour un prélèvement a) d'enfant (LAL) et b) d'adulte (LAM) après 2 h d'incubation à 2 µM.
- Figure 23: pourcentage de cellule en fonction du nombre de vésicules par cellule pour chaque prélèvement au diagnostic.
- Figure 24: Pourcentage de cellules ne présentant pas de vésicules cytoplasmiques marquées par la fluorescence de la DNR: comparaison entre prélèvements d'enfants (n=7) et d'adultes (n=4) incubés pendant 2 h avec la DNR seule à 2 μM ou avec la DNR co-incubée avec le PSC-833 à 5 μM.
- Figure 25: Cinétique d'efflux après 2 h d'incubation en présence d'épirubicine (A-B) ou d'idarubicine (C-D) représentée par les intensités de fluorescence relatives (IFR) mesurées par cytométrie en flux pour les lignées A549, A549 T<sub>3</sub>, A549 V<sub>3</sub>, MCF-7 et MCF-7<sup>DXR</sup>.
- Figure 26: Distribution intracellulaire de l'épirubicine (EPI) (a et c) et de l'idarubicine (IDA) (b et d) observée par microscopie en épifluorescence avec un objectif 100X, représentée selon la même dynamique de niveaux de gris. Cellules MCF-7 (a et b), cellules MCF-7<sup>DXR</sup> (c et d). Localisation du noyau par une flèche.
- Figure 27: Distribution intracellulaire de l'épirubicine (EPI) (a, c et e) et de l'idarubicine (IDA) (b, d et f) observée par microscopie de fluorescence avec un objectif 100X, représentée selon la même dynamique de niveaux de gris. Cellules A549 (a et b), cellules A549 T<sub>3</sub> (c et d), cellules A549 V<sub>3</sub> (e et f). Localisation du noyau par une flèche.
- Figure 28: Evaluation simultanée de la variation de la fraction cellulaire (cellules traitées/cellules témoins) en SubG<sub>1</sub> (histogrammes) et en G<sub>2</sub>/M (courbes), pendant et après une exposition de 24 h à l'épirubicine (A) ou à l'idarubicine (B) pour les lignées cellulaires A549, A549 T<sub>3</sub> et A549 V<sub>3</sub>.
- Figure 29: Evaluation simultanée de la fraction cellulaire (cellules traitées/cellules témoins) en SubG<sub>1</sub> (histogrammes) et en G<sub>2</sub>/M (courbes), pendant et après une exposition de 24 h à l'épirubicine (A) ou à l'idarubicine (B) pour les lignées cellulaires MCF-7 et MCF-7<sup>DXR</sup>.
- Figure 30: Illustration des différents caractères morphologiques cellulaires mis en évidence en microscopie par le marquage au Hoechst 33342 (a f et i l)ou à l'iodure de propidium (g h). Différentes images de mitoses (a c), de cellules multi-nuclées (d), et de cellules comportant des micronoyaux (e f). Des cellules nécrotiques (g h). Différentes étapes de l'apoptose; la margination précoce (i) et tardive (j), les corps apototiques (k l).
- Figure 31: Dommages induits, pour la lignée A549, après 24 h de contact par l'épirubicine (EPI) ou l'idarubicine (IDA) et mis en évidence par le Hoechst (a -b; d -e) et l'I-P (c, f)). Illustration de cellules : A549 seules (a); avec l' IDA (b -c) ou l'EPI (d -f). Cellules apoptotiques (petites flèches) marquées au Hoechst (b, e) et ayant perdues leur intégrité membranaire (c, f). Les images c et e/f proviennent du même champ d'acquisition que pour les images b et d, mais correspondent à un plan de focalisation supérieur.
- Figure 32: Dommages induits pour la lignée MCF-7, après 24 h de contact puis 48h plus tard par l'épirubicine (EPI) ou l'idarubicine (IDA) et mis en évidence par le Hoechst (a, c, e, f, h, i) et l'IP (b, d, g, j). Illustration de cellules MCF-7: non traitées à 24 h (a -b) et 48 h plus tard (c -d); traitées par l'IDA (e, f, g) ou l'EPI (h, i, j) après 24h de contact (e et h) et 48 h plus tard (f, g et i, j). Cellule nécrotique (longue flèche) marquée au Hoechst (a) et à l'IP (b). Cellules apoptotiques (petites flèches) marquées au Hoechst (f, i) et à l'IP (g, j). Cellules comportants des micronoyaux marquées par le Hoechst (petites flèches épaisses) (f, h). Les images g et j proviennent du même champ d'acquisition que pour les images f et i, mais correspondent à un plan de focalisation supérieur.
- Figure 33: Cinétique de l'expression relative de l'ARNm de p53 par RT-PCR pendant et après l'exposition à l'épirubicine (E) ou à l'idarubicine (I), respectivement pour les lignées A549 (A) et MCF-7 (B). Les données sont exprimées par rapport au RER (p53/gapdh) mesuré sur des cellules non traitées.
- Figure 34: Evaluation par RT-PCR de l'expression relative de p53, à 8 h et 24 h d'incubation en présence d'EPI ou d'IDA pour les lignées A549, A549 T<sub>3</sub> et A549 V<sub>3</sub>. Les données sont exprimées par rapport au RER (p53/gapdh) mesuré sur des cellules non traitées.
- Figure 35: Induction de la protéine P53, évaluée par *western-blot*, pendant et après exposition à l'IDA ou à l'EPI. Les échantillons témoins non traités se trouvent dans la colonne (T). L'évaluation de l'expression protéique est réalisée pendant le contact avec l'anthracycline (1, 4, 8 et 24 h), puis 24 h après le contact (+ 24). Les résultats sont présentés pour les lignées A549 (A), A549 T<sub>3</sub> (B), A549 V<sub>3</sub> (C), MCF-7 (D) et MCF-7<sup>DXR</sup> (E). L'échelle de masse moléculaire des protéines est indiquée en kDa.
- Figure 36: Induction de la protéine Bax, évaluée par *western-blot*, pendant et après exposition à l'idarubicine (IDA) ou à l'épirubicine (EPI). Les échantillons témoins non traités se trouvent dans la colonne (T). L'évaluation de l'expression de la protéine est réalisée pendant le contact avec l'anthracycline (1, 4, 8 et 24 h), puis 24 h après le contact (+ 24). Les résultats sont présentés pour les lignées A549 (A), A549 T<sub>3</sub> (B), A549 V<sub>3</sub> (C), MCF-7 (D) et MCF-7<sup>DXR</sup> (E). L'échelle de masse moléculaire des protéines est indiquée en kDa.
- Figure 37: Cinétique de production des céramides pour les lignées parentales MCF-7 et A549: évaluation de la exposées à une IC<sub>50</sub> d'EPI ou d'IDA. Les données sont exprimées par rapport au % de céramide mesuré sur des cellules non traitées.

#### LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1: Indications thérapeutiques des anthracyclines selon Booser et al (Booser and Hortorbagyi, 1994).
- Tableau 2: Effets d'agents chimiothérapeutiques sur la topoisomérase II d'après Isaacs et al.
- Tableau 3: Classes des gènes mdr selon Skovsgaard et al. (Skovsgaard et al., 1994)
- Tableau 4: Localisations principales de l'expression de mdr1 et mrp1 dans les tissus sains
- Tableau 5: Localisations principales de l'expression de mdr1et mrp1 dans les tissus tumoraux
- Tableau 6: Récapitulatif des caractéristiques des lignées
- Tableau 7: Résumé des paramètres optimisés pour la co-amplification des gènes d'intérêts/référence
- Tableau 8: composition du tampon RIPA
- Tableau 9: Composition des gels de séparation (run, R) et de concentration (stacking, STK)
- Tableau 10: Composition des tampons de transfert
- Tableau 11: Conditions de détection des protéines d'intérêt
- Tableau 12: Ratio de fluorescence de la DNR ( $\rho_{560/594}$  et  $\rho_{548/594}$ ) obtenus au niveau de la région golgienne pour les deux lignées après 2 ou 24 h d'incubation.
- Tableau 13: Critères de référence d'analyse des prélèvements de leucémies de LAL d'enfants (1 à 8) et de LAM d'adultes (9 à 12).
- Tableau 14: Comparaison des répartitions des pourcentage cellulaires en fonction du nombre de vésicule marquées par la fluorescence de la DNR pour les prélèvements au diagnostic.
- Tableau 15: Accumulation après 2 h d'incubation d'épirubicine (EPI) ou d'idarubicine (IDA) évaluée par l'intensité de fluorescence relative (IFR), mesurée en cytométrie en flux.
- Tableau 16: Cytotoxicité évaluée après un traitement de 2 h avec l'EPI ou l'IDA, mais mesuré 72 h plus tard.
- Tableau 17: Cytotoxicité évaluée après un traitement de 24 h avec l'EPI ou l'IDA, mais mesuré 48 h plus tard.
- Tableau 18: Modification du marquage de l'ADN induit après 24 h de contact avec l'épirubicine ou l'idarubicine; quantification soit par la morphologie en microscopie soit par la région du sub-G<sub>1</sub> en cytométrie en flux

### RAPPORT DE SOUTENANCE

## Concernant la thèse de **Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1**, en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT - Spécialité : Génie Biologique et Médical

### Présentée par : Madame Corinne BOUR épouse DILL Date de la soutenance : VENDREDI 12 JANVIER 2001

# Sur le sujet suivant : "DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES ANTHRACYCLINES : IMPLICATION DANS LE PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE INDUITE ET LE PHENOTYPE DE RESISTANCE PLEIOTROPE".

Le jury a apprécié la qualité et la clarté de l'exposé oral (utilisation de la projection *via* ordinateur) dont la très bonne construction a bien reflété l'intensité du travail réalisé et a permis de dégager les points essentiels des nombreuses études décrites dans le mémoire (la candidate est auteur de 4 publications dans des revues internationales à comité de lecture). De plus, l'aspect didactique de la présentation a été souligné.

Lors des questions du jury, la candidate a su répondre avec aisance et forte conviction traduisant non seulement sa très bonne connaissance du sujet, mais aussi le fait que pour réaliser sa recherche elle a fait appel à de très nombreuses méthodologies (souvent complémentaires) et à différents concepts allant de la biophysique à la biologie moléculaire.

En conséquence, le jury a décerné à l'unanimité le titre de Docteur de l'Université Henri Poincaré Nancy I à Madame Corinne BOUR-DILL avec la <u>mention très honorable</u> et a tenu à l'assurer de ses félicitations pour l'ensemble de ses travaux.

Mention accordée

→ honorable
→ A très honorable
→ Honorable avec félicitations

Signatures : **Président du Jury** : Nom et signature

& Marie Laure VIREOT

Membres du Jury :

Pr M. MANFAIT -	Dr J.P. JAFFREZOU	Pr F. GUILLEMIN
Dr M.L. VIRIOT	Dr.J.L. MERLIN	Pul

À retourner au Service des Spécialités de la Faculté de Médecine dans les meilleurs délais.

DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES ANTHRACYCLINES: Implication dans le

### processus de mort cellulaire induite et le phénotype de résistance pleiotrope.

La principale cause d'échecs rencontrés en chimiothérapie avec les anthracyclines est souvent associée à la multidrug résistance (MDR) classique. En première partie, les expérimentations in vitro ont monté par analyse d'images que l'appareil de Golgi est le principal site de séquestration de la daunorubicine (DNR) pour notre modèle surexprimant la glycoprotéine-P (P-gp). La séquestration de la DNR dans ce compartiment implique une modification de son spectre de fluorescence suggérant des interactions avec les lipides. L'inhibition de la P-gp par des combinaisons de réversants à faibles concentrations, parmi lesquels le PSC-833 connu pour agir sur les lipides intracellulaires, restaure la cytotoxicité de la DNR pour la lignée résistante en modulant sa distribution cytoplasmique sans agir sur son accumulation intracellulaire. En clinique, le PSC-833 module l'accumulation de la DNR, ainsi que partiellement sa distribution subcellulaire. En seconde partie l'idarubicine (IDA) a été comparée à l'épirubicine (EPI) in vitro par l'intermédiaire de l'incorporation et de la réponse cellulaire, en particulier pour des lignées surexprimant la P-gp ou la multidrug resistance related protein (MRP). Concernant les propriétés pharmacologique, l'IDA se distingue de l'EPI par une accumulation intracellulaire plus rapide, un efflux retardé en présence de MRP, ainsi qu'un profil de distribution plus large que l'EPI suggérant des sites d'action cytoplasmiques différents. Ces propriétés se traduisent pour l'IDA par une cytotoxicité accrue pour toutes les lignées. En outre, le blocage en G2/M et/ou l'induction de P53, qui traduisent l'endommagement de l'ADN, ne suffisent pas à assurer l'entrée des cellules en apoptose. L'activation précoce de la voie des céramides est plus prononcée en présence d'IDA pour les lignées sensibles, et semble spécifique à l'induction d'apoptose. L'ensemble des données collectées suggèrent qu'en plus de son site d'action nucléaire, l'IDA agisse également au niveau cytoplasmique.

### INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF ANTHRACYCLINES: Implication in cell death

### pathway and phenotype of pleiotropic resistance.

The main cause of failure in anthracyclines chemotherapy is the classical phenotype of multidrug resistance (MDR). The first part of this study characterized cytoplasmic sequestration of daunorubicin (DNR) mediated by P-glycoprotein (P-gp) and its role in DNR cytotoxicity. In vitro experiments with sensitive and resistant cell lines using image analysis, demonstrated that Golgi apparatus is the main target of DNR sequestration. The fluorescence spectra of DNR in both cell lines inside Golgi suggested specific interactions between DNR and lipids in resistant cell line. P-gp inhibiton by combinations of suboptimal concentrations of modulators including PSC-833 known to be acting on intracellular lipids reverted DNR cytotoxicity without modulating its intracellular accumulation but allowed DNR redistribution inside cytoplasm. DNR accumulation was modulated by PSC-833. Additionnaly DNR cytoplasmic sequestration was partially moduled by PSC-833. The second part of this work measured in vitro the impact of idarubicin (IDA) lipophilicity as compared with epirubicin (EPI), on cellular incorporation and cell response. These parameters were evaluated in relation with P-gp or multidrug resistance related protein (MRP) overexpression. IDA incorporation is faster, but as EPI, IDA is a substrate for P-gp. IDA is distinguished by delayed efflux in presence of MRP. Moreover IDA was characterized by a larger pattern of subcellular distribution. These later properties implied a higher cytotoxicity for IDA whatever the cell lines. G<sub>2</sub>/M arrest of cells and/or effective P53 induction by both anthracyclines traduced DNA damages but were not sufficient to specifically activate apoptosis. The early production of ceramides was higher after IDA treatment, and seemed to be specifically associated with apoptosis. The data collected during this study suggested that in addition its nuclear target, IDA induced cell death by acting onto cytoplasmic targets.

### Mots clés : Anthracyclines séquestration, multidrug resistance, G2/M, apoptose, céramide

Ecole Doctorale de Biologie et Santé - Centre Alexis Vautrin, Av Bourgogne 54510 Vandoeuvre les Nancy

le 27 642001 Dil