

---

Université de Montréal

**Caractérisation de la P-glycoprotéine des capillaires  
cérébraux et tissus sains**

par

Édith Beaulieu

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
**Philosophiæ Doctor (Ph.D.)**  
en physiologie

---

Mai 1997

©Édith Beaulieu, 1997



W  
4  
U58  
1998  
V.010

Université de Montréal

Caractérisation de la P-glycoprotéine des capillaires  
cérébraux et tissus sains

par  
Édith Beaulieu

Département de physiologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophie Doctor (Ph.D.)  
en physiologie

Mai 1997

Édith Beaulieu 1997



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures


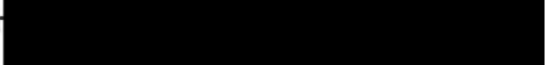
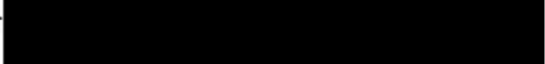
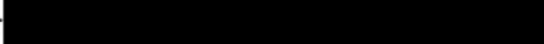
Cette thèse intitulée:

Caractérisation de la P-glycoprotéine des capillaires  
cérébraux et tissus sains

présentée par:

Édith Beaulieu

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur		... Président rapporteur
Docteur		... Directeur de recherche
Docteur		..... Membre du jury
Docteur		... Examineur externe

Thèse acceptée le: .....98.02.06.....



Université de Montréal

Bibliothèque



---

**DÉDICACE**

À FEU MARIO PLOUFFE,

*Il a été pour moi un phare et une raison de mettre tout mon coeur et toutes mes énergies à ce projet de recherche dans le cadre de mon doctorat. Qu'il trouve ici une infime partie de ce qu'il aurait aimé réaliser lui-même. Qu'il trouve également l'expression de toute mon amitié.*

---

## REMERCIEMENTS

Merci tout d'abord à mon directeur, Richard Béliveau, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire au sein d'une équipe dynamique et ainsi me permettre d'effectuer ces études doctorales. Merci également d'avoir cru en moi, de m'avoir communiqué la passion de la recherche et de m'avoir stimulée intellectuellement.

Merci à mes parents de m'avoir tout donné, leur amour, leur soutien et leurs encouragements prodigués de mille et une façons. Merci de m'avoir transmis la soif de connaissance, la volonté, le courage et l'ambition qui m'ont permis d'entreprendre et mener à terme ce projet d'études et de nombreux autres projets. Merci également aux autres membres de ma famille, la famille à Steve et mes amis qui m'ont soutenu de près ou de loin pendant toutes ces années.

Merci à mes collègues de laboratoire. À Michel (Dr Demeule) pour ses nombreux conseils, sa patience, sa collaboration et sa disponibilité. À Marie-France pour son support moral et technique, ses encouragements et sa précieuse amitié. À Christian pour sa collaboration, sa complicité et son amitié. À Diane pour sa générosité intellectuelle, son soutien et son amitié. À André pour sa joie de vivre, sa générosité et son imagination. À Sylvie pour ses encouragements et son amitié. À Éric pour ses petites attentions très appréciées et sa serviabilité. À Denis pour ses judicieux conseils et sa collaboration. À Richard Desrosiers pour ses conseils et ses idées. À Marie-Claude pour ses encouragements, sa générosité et sa disponibilité. À Vincent pour ses corrections critiques de mes manuscrits. À Marc pour sa jovialité. À Julie Poirier pour son aide et conseils techniques. À Sylvie Giroux, Lise Tremblay, Dominique, Julie Pelletier, Daniel et Jean-François pour avoir contribué à mes premiers pas dans le laboratoire. À Wei et Yansen pour le partage de leur culture et leur collaboration. À Marie-Annick, Arash, Isabel, France, Alain, Mathieu et Charles pour le renouveau qu'ils procurent au laboratoire.

Je tiens à remercier le FCAR (Fonds pour la formation de chercheur et l'aide à la recherche), la FES (Faculté des études supérieures) de l'Université de Montréal et le GRTM (Groupe de recherche en transport membranaire) pour les bourses qui m'ont permis d'effectuer mes études et acquérir une formation de chercheur.

Finalement, je tiens à remercier Steve pour sa présence, son soutien, ses encouragements, sa complicité, sa disponibilité et sa compréhension pendant cette grande étape de ma vie.

---

## SOMMAIRE

Un obstacle majeur au traitement clinique du cancer est la résistance pléiotropique aux médicaments. Cette résistance est principalement associée à la surexpression d'une protéine membranaire de 150-180 kDa, la P-glycoprotéine, qui agit comme une pompe en expulsant activement les médicaments chimiothérapeutiques hors des cellules tumorales par un mécanisme dépendant de l'ATP. La P-glycoprotéine est une protéine d'environ 1280 acides aminés, qui selon le modèle établi par les profils d'hydrophobicité, comporte 12 segments transmembranaires et des domaines hydrophiles parmi lesquels on retrouve un site de glycosylation extracellulaire et deux sites cytoplasmiques de liaison des nucléotides. En plus des cellules tumorales, la P-glycoprotéine est exprimée dans de nombreux tissus sains dont les capillaires cérébraux où elle est fortement exprimée. Les travaux effectués au cours de ce doctorat ont porté sur la caractérisation de la P-glycoprotéine, particulièrement au niveau des capillaires cérébraux. Ces travaux ont permis la rédaction de trois articles.

Le premier article traite de l'immunoréactivité de l'anticorps monoclonal C219 avec deux protéines de 155 et 190 kDa des capillaires cérébraux isolés de boeufs et de rats. La caractérisation de ces deux protéines a été effectuée par des traitements physico-chimiques afin de déterminer laquelle des deux protéines représente la P-glycoprotéine. Un profil de solubilisation par différents détergents a été établi pour chacune des deux protéines et ces profils ont été comparés avec celui de la P-glycoprotéine des CH<sup>R</sup>C5, une lignée de cellules tumorales résistantes à la colchicine provenant d'ovaires de hamsters chinois. La protéine de 155 kDa (p155) des capillaires cérébraux et la P-glycoprotéine des CH<sup>R</sup>C5 sont bien solubilisées en présence de certains détergents tandis que la protéine de 190 kDa (p190) est seulement extraite avec du sodium dodécyl sulfate (SDS). Le partitionnement dans le Triton X-114 a démontré que la p155 se comporte comme une protéine membranaire tandis que la p190 demeure insoluble. La déglycosylation des protéines des capillaires cérébraux diminue la masse moléculaire apparente de la p190 de 7-8 kDa et celle de la p155 de 27-28 kDa, une variation similaire à la P-glycoprotéine des CH<sup>R</sup>C5. De plus, la p190 n'est pas immunoprécipitée par l'anticorps monoclonal C219 tandis que la p155 et la P-glycoprotéine des CH<sup>R</sup>C5 le sont. Ces résultats suggèrent donc que la p155 est la P-glycoprotéine des capillaires cérébraux et que l'anticorps monoclonal C219 possède une réactivité croisée avec la p190. Ces résultats suggèrent également que l'utilisation de cet anticorps dans le diagnostic du phénomène de résistance pléiotropique aux médicaments par immunohistochimie pourrait mener à des faux positifs.

Dans le deuxième article, l'expression de la P-glycoprotéine a été étudiée dans des préparations de membranes totales de différents tissus d'humains, de hamsters, de rats, de



lapins et de souris par immunobuvardage de type Western avec trois anticorps monoclonaux (C219, C494 et JSB-1) et un anticorps polyclonal (Ab-1). Avec le C219, la P-glycoprotéine est détectée dans tous les tissus (intestins, foie, rate, reins, testicules, coeur, thymus, poumons, muscle, cerveau et estomac) sauf le pancréas. L'anticorps polyclonal Ab-1 révèle la présence de la P-glycoprotéine dans les intestins, le foie, les reins, les testicules, le coeur, les poumons et le cerveau. Les anticorps monoclonaux C494 et JSB-1 détectent la P-glycoprotéine dans les membranes des CH<sup>R</sup>C5 mais pas dans les membranes totales de tissus, à l'exception des reins humains où la P-glycoprotéine a été détectée par le JSB-1. Bien qu'avec chacun de ces anticorps, des protéines non-spécifiques sont détectées le C219 semble plus spécifique. Ainsi, l'anticorps monoclonal C219 semble le plus approprié pour effectuer des tests cliniques mais peut quand même introduire quelques faux positifs. L'expression de la P-glycoprotéine dans la plupart des tissus étudiés suggère également un rôle physiologique fondamental pour cette protéine.

Finalement, le troisième article consistait en l'étude de l'expression de la P-glycoprotéine dans les membranes luminales isolées de l'endothélium vasculaire du cerveau, du coeur et des poumons. L'immunodétection de la P-glycoprotéine a démontré sa présence dans les membranes luminales des cellules endothéliales des trois tissus. Un très fort enrichissement a été mesuré dans les membranes luminales des vaisseaux sanguins du cerveau comparativement aux capillaires cérébraux (17 fois) et aux membranes totales du cerveau (400-500 fois), indiquant que la P-glycoprotéine est principalement exprimée du côté luminal des cellules endothéliales dans ce tissu. L'immunodétection du transporteur de glucose GLUT-1, de GFAP, de l'adaptine, de l'IP<sub>3</sub>R-3, de l'intégrine  $\alpha$ v et du collagène IV a été effectuée comme contrôle pour évaluer la contamination des préparations de membranes luminales. Un fort enrichissement de GLUT-1 dans les membranes luminales des cellules endothéliales du cerveau comparativement aux capillaires cérébraux (9,9 fois) démontre qu'il s'agit bien de membranes provenant de cellules endothéliales. Un faible enrichissement de GFAP (1,4 fois) et de l'adaptine (2,4 fois) et une diminution d'IP<sub>3</sub>R-3, de l'intégrine  $\alpha$ v et du collagène exclut la possibilité d'une contamination majeure par des astrocytes, des membranes internes ou anti-luminales. Le haut niveau d'expression de la P-glycoprotéine dans les membranes luminales des capillaires cérébraux suggère qu'elle peut jouer un rôle important dans la barrière limitant l'accès des agents chimiothérapeutiques au cerveau.

En conclusion, ces travaux suggèrent que la P-glycoprotéine a une implication physiologique dans la plupart des tissus. Elle semble particulièrement importante au niveau des capillaires cérébraux où sa localisation luminale renforce son implication possible dans la barrière hémato-encéphalique ainsi que dans la résistance pléiotropique aux médicaments.

## TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE TITRE.....	i
IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
DÉDICACE.....	iii
REMERCIEMENTS .....	iv
SOMMAIRE.....	vi
TABLE DES MATIÈRES .....	viii
LISTE DES TABLEAUX .....	xi
LISTE DES FIGURES .....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Le cancer et la progression tumorale.....	1
1.1.1 Les approches thérapeutiques anticancéreuses.....	1
1.2 La résistance à la chimiothérapie.....	3
1.2.1 La résistance médiée par la P-glycoprotéine .....	3
1.2.2 Implication de MRP dans la résistance à la chimiothérapie.....	5
1.2.3 Implication de LRP dans la résistance à la chimiothérapie .....	5
1.2.4 Autres mécanismes de résistance.....	6
1.3 Analyse moléculaire de la P-glycoprotéine .....	7
1.3.1 Clonage et séquençage de la P-glycoprotéine.....	7
1.4 Rôle de l'ATP dans la fonction de la P-glycoprotéine .....	9
1.4.1 Identification des sites de liaison de l'ATP.....	10
1.4.2 Importance de l'ATP pour la fonction de la P-glycoprotéine .....	11
1.4.3 Caractérisation de l'activité ATPasique de la P-glycoprotéine .....	12
1.4.4 Importance des résidus cystéine dans l'activité ATPasique de la P-glycoprotéine .....	14
1.5 Modifications post-traductionnelles de la P-glycoprotéine .....	15
1.5.1 Glycosylation de la P-glycoprotéine .....	15
1.5.1.1 Rôle de la glycosylation dans la fonction de la P-glycoprotéine .....	16
1.5.2 Phosphorylation de la P-glycoprotéine .....	17

1.5.2.1 Rôle de la phosphorylation dans la fonction de la P-glycoprotéine .....	18
1.6 Distribution tissulaire de la P-glycoprotéine.....	19
1.6.1 La P-glycoprotéine dans les tissus sains .....	19
1.6.1.1 Expression de la P-glycoprotéine dans les tissus .....	19
1.6.1.2 Détermination des classes de P-glycoprotéine.....	21
1.6.1.3 Fonctions possibles des différentes classes de P-glycoprotéine .....	22
1.6.2 La P-glycoprotéine dans les tumeurs .....	24
1.6.2.1 Expression de la P-glycoprotéine dans les tumeurs.....	24
1.6.2.2 Implication de la P-glycoprotéine dans les tumeurs.....	24
1.6.2.3 La P-glycoprotéine et les tumeurs cérébrales .....	25
1.7 Implication de la P-glycoprotéine dans la barrière hémato-encéphalique .....	26
1.7.1 Description morphologique de la barrière hémato-encéphalique.....	26
1.7.1.1 Les jonctions serrées .....	26
1.7.1.2 Polarisation des cellules endothéliales.....	29
1.7.1.3 Absence de fenestration et faible pinocytose des cellules endothéliales.....	29
1.7.2 Expression de la P-glycoprotéine dans les capillaires cérébraux .....	30
1.7.2.1 Fonction dans la protection du cerveau.....	30
1.7.2.2 Fonction dans la détoxification du cerveau .....	32
1.7.2.3 Fonction de sécrétion.....	35
1.7.2.4 Fonction de transport de peptides.....	36
1.7.2.5 Fonction de canal au chlore.....	37
1.8 Stratégie de recherche.....	39
1.8.1 Réactivité croisée de l'anticorps monoclonal C219 dans les capillaires cérébraux .....	39
1.8.2 Distribution tissulaire de la P-glycoprotéine par immunobuvardage de type Western.....	40
1.8.3 Expression luminale de la P-glycoprotéine dans les capillaires cérébraux .....	41
2. MANUSCRITS.....	42
2.1 P-glycoprotein of blood brain barrier: cross-reactivity of mAb C219 with a 190 kDa protein in bovine and rat isolated brain capillaries.....	43
2.2 Assessment of P-glycoprotein expression in human and animal tissues	

by immunoblotting with various antibodies .....	68
2.3 P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain.....	104
3. DISCUSSION.....	136
3.1 La P-glycoprotéine des capillaires cérébraux, réactivité croisée de l'anticorps monoclonal C219.....	136
3.2 Distribution tissulaire de la P-glycoprotéine par immunobuvardage de type Western .....	141
3.3 Expression de la P-glycoprotéine dans les membranes lumineales des capillaires cérébraux .....	152
4. CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES.....	157
5. RÉFÉRENCES .....	161
6. ANNEXES.....	178
6.1 Contribution des coauteurs.....	178
6.2 Contribution à des articles non-inclus dans cette thèse.....	179
6.3 Copie des articles publiés.....	180

---

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Thèse</b>	<b>Caractérisation de la P-glycoprotéine des capillaires cérébraux et tissus sains.</b>	<b>Page</b>
Tableau 1.1	Classes d'agents interagissant avec la P-gp .....	4
Tableau 1.2	Famille des gènes de la P-glycoprotéine .....	8
Tableau 1.3	Anticorps dirigés contre la P-gp .....	41
<b>Manuscrit 1.</b>	<b>P-glycoprotein of blood brain barrier: cross-reactivity of mAb C219 with a 190 kDa protein in bovine and rat isolated brain capillaries.</b>	
Table I	Solubilisation of P-gp from the membrane of CH <sup>R</sup> C5 cells and proteins from brain capillaries detected with MAb C219 .....	61
<b>Manuscrit 2.</b>	<b>Assessment of P-glycoprotein expression in human and animal tissues by immunoblotting with various antibodies.</b>	
Table I	Detection of P-gp from different tissues of various species with mAb C219.....	90
<b>Manuscrit 3.</b>	<b>P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain.</b>	
Table I	Enrichment of proteins in capillary luminal membranes compared to corresponding total membranes and to brain capillaries.....	123

## LISTE DES FIGURES

<b>Thèse</b>	<b>Caractérisation de la P-glycoprotéine des capillaires cérébraux et tissus sains.</b>	<b>Page</b>
Figure 1.1	Modèle de l'organisation de la P-gp humaine dans la membrane plasmique.....	9
Figure 1.2	Localisation des épitopes reconnus par trois anticorps monoclonaux.....	11
Figure 1.3	Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique.....	27
Figure 1.4	Micrographie électronique d'un capillaire cérébral.....	28
<b>Manuscrit 1.</b>	<b>P-glycoprotein of blood brain barrier: cross-reactivity of mAb C219 with a 190 kDa protein in bovine and rat isolated brain capillaries.</b>	
Figure 1.	Detection of P-gp from brain capillaries .....	62
Figure 2.	Solubilisation of P-gp from brain capillaries .....	63
Figure 3.	Phase partitioning of brain capillary proteins with Triton X-114.....	64
Figure 4.	Deglycosylation of brain capillary and CH <sup>R</sup> C5 membrane proteins....	65
Figure 5.	Inhibition of MAb C219 binding by peptide VQEALD.....	66
Figure 6.	Immunoprecipitation of brain capillary proteins and P-gp from CH <sup>R</sup> C5 cells with MAb C219.....	67
<b>Manuscrit 2.</b>	<b>Assessment of P-glycoprotein expression in human and animal tissues by immunoblotting with various antibodies.</b>	
Figure 1A.	Detection of P-gp from human tissues by mAb C219.....	91
Figure 1B.	Detection of P-gp from human tissues by pAb Ab-1.....	92

Figure 1C.	Detection of P-gp from human tissues by mAb C494.....	93
Figure 1D.	Detection of P-gp from human tissues by mAb JSB-1.....	94
Figure 2A	Detection of P-gp from hamster tissues by mAb C219 .....	95
Figure 2B	Detection of P-gp from hamster tissues by mAb C494 .....	96
Figure 2C	Control of secondary antibody in detection of P-gp from hamster tissues.....	97
Figure 3A.	Detection of P-gp from rat tissues by mAb C219.....	98
Figure 3B.	Detection of P-gp from rat tissues by pAb Ab-1 .....	99
Figure 4.	Detection of P-gp from rabbit tissues using mAb C219 .....	100
Figure 5A.	Detection of P-gp from mouse tissues .....	101
Figure 5B.	Control of secondary antibody in detection of P-gp from mouse tissues .....	102
Figure 6.	Detection of P-gp from human tumors using mAb C219.....	103

**Manuscript 3. P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain.**

Figure 1.	Outline of the procedure used for the isolation of luminal membranes from endothelial cells .....	124
Figure 2A.	Immunodetection of P-gp in luminal membranes by mAb C219 .....	125
Figure 2B.	Immunodetection of P-gp in luminal membranes by pAb Ab-1.....	126
Figure 3.	Deglycosylation of P-gp from brain capillaries .....	127
Figure 4.	Photoaffinity labelling of P-gp in brain capillaries.....	128
Figure 5.	Electron micrographs of luminal membranes from brain .....	129

Figure 6A.	Determination of cellular membrane type .....	130
Figure 6B.	Immunodetection of astrocytes marker.....	131
Figure 7A.	Immunodetection of Golgi apparatus membrane marker.....	132
Figure 7B.	Immunodetection of endoplasmic reticulum membrane marker.....	133
Figure 8A.	Immunodetection of anti-luminal membrane marker .....	134
Figure 8B.	Immunodetection of basal membrane marker .....	135

---



**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ABC	ATP binding cassette, domaine de liaison de l'ATP
ADN	acide désoxyribonucléique
AMP	adénosine monophosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate
DNP	2,4-dinitrophénol
GFAP	Glial fibrillary acidic protein, protéine de fibre gliale acide
GST	glutathione <i>S</i> -transférase
IAAP	[ <sup>125</sup> I]iodoaryl azidoprazosin
kDa	kilodalton
LRP	lung resistance protein, protéine associée à la résistance pulmonaire aux médicaments
MDR	multidrug resistance, résistance pléiotropique aux médicaments
MRP	multidrug resistance associated protein, protéine associée à la résistance pléiotropique aux médicaments
NEM	<i>N</i> -éthylmaléimide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis, gel d'électrophorèse de polyacrylamide
P-gp	P-glycoprotéine
PKA	protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique
PKC	protéine kinase dépendante du calcium
SNC	système nerveux central
SDS	sodium dodécyl sulfate
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Le cancer et la progression tumorale

Les cancers proviennent habituellement d'une seule cellule qui subit un dérèglement cellulaire déclenchant sa prolifération à un moment où elle ne devrait pas se diviser (Weinberg, 1996). Ce dérèglement cellulaire semble être causé par l'accumulation de plusieurs mutations dans leurs gènes, particulièrement ceux impliqués dans le cycle cellulaire, les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les proto-oncogènes stimulent la croissance cellulaire et certaines mutations peuvent les transformer en oncogènes et entraîner une multiplication excessive des cellules. Au contraire, des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs peuvent les rendre inactifs et les empêcher d'inhiber la division cellulaire (Weinberg, 1996). Plusieurs de ces protéines sont maintenant identifiées, permettant de mieux comprendre les mécanismes cellulaires du cancer. D'autres mutations des protéines des cellules tumorales peuvent par la suite permettre aux tumeurs d'envahir les tissus avoisinants et ainsi développer un cancer. Ces cellules cancéreuses peuvent, dans certains cas, atteindre la circulation sanguine et se disséminer dans l'organisme pour former des métastases (Liotta, 1995; Weinberg, 1996).

##### 1.1.1 Les approches thérapeutiques anticancéreuses

Ces progrès remarquables dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables du déclenchement et de la croissance des cancers ont permis de développer différentes approches thérapeutiques anticancéreuses. Toutefois, ces progrès n'ont cependant eu que peu d'incidence sur les taux de mortalité associés à cette maladie.

Ainsi, durant les 25 dernières années, le taux de mortalité associé au cancer a augmenté de 6,3 pourcent dans les pays industrialisés résultant du décès d'environ six millions de personnes chaque année (Rennie and Rusting, 1996). Toutefois, les décès associés à certains cancers tels le lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin, le cancer des testicules et plusieurs tumeurs malignes affectant les enfants sont en nette régression, en particulier chez ces derniers où le taux de décès a diminué de 62 pourcent depuis 1960 (Rennie and Rusting, 1996). Ces progrès sont dus à un ensemble de traitements anticancéreux qui visent à combattre la croissance incontrôlée des tumeurs, l'invasion des tissus sains par les tumeurs et la formation de métastases (Hellman and Vokes, 1996). Trois principaux modes de traitements anticancéreux sont couramment employés, soit l'ablation chirurgicale de la tumeur, la radiothérapie et la chimiothérapie (Hellman and Vokes, 1996). L'ablation chirurgicale de la tumeur demeure d'une efficacité limitée car elle ne permet pas nécessairement l'élimination des extensions tumorales microscopiques et le tissu sain qui est également prélevé lors de la chirurgie peut nuire au fonctionnement des organes. La radiothérapie, qui consiste à irradier les tumeurs avec des rayons X et  $\gamma$ , vise quant à elle à créer des lésions suffisantes pour tuer les cellules tumorales ou à induire l'apoptose de ces cellules, tandis que les cellules saines résistent mieux à ce traitement. Cette méthode présente l'avantage de détruire les extensions microscopiques des tissus cancéreux mais ne parvient pas à détruire toutes les cellules cancéreuses qui se sont disséminées dans l'organisme. La chimiothérapie, quant à elle, consiste en l'administration de médicaments anticancéreux, seuls ou en combinaisons, qui atteindront tout le corps via la circulation sanguine. Certains agents chimiothérapeutiques, dont les antimétabolites et les alcaloïdes végétaux, empêchent la division cellulaire tandis que d'autres, dont les inhibiteurs de la topoisomérase et les agents alkylants, induisent l'apoptose des cellules tumorales (Hellman and Vokes, 1996). Les traitements chimiothérapeutiques ont toutefois l'inconvénient de tuer de nombreuses cellules saines, entraînant de nombreux effets secondaires comme les nausées, les vomissements et la perte de cheveux. Un des

inconvenients majeurs de la chimiothérapie demeure cependant la résistance développée par les cellules tumorales envers les divers agents anticancéreux. Cette résistance peut être présente dès la première administration de médicaments ou peut se développer suite aux traitements. La résistance peut être multiple ou pléiotropique, c'est à dire que les cellules deviennent résistantes à de nombreux agents, même après l'administration d'un seul médicament.

## **1.2 La résistance à la chimiothérapie**

### **1.2.1 La résistance médiée par la P-glycoprotéine**

L'implication d'une protéine dans le phénomène de résistance à la chimiothérapie a été initialement suggérée par l'observation selon laquelle l'accumulation réduite de certains médicaments dans des cellules tumorales était associée à l'augmentation de l'expression d'une protéine de surface (Biedler and Riehm, 1970; Danø, 1973; Juliano and Ling, 1976). Il est maintenant bien établi que cette protéine membranaire, la P-glycoprotéine (P-gp), est responsable du phénomène de résistance pléiotropique aux médicaments, appelé MDR pour "multidrug resistance" en expulsant des médicaments chimiothérapeutiques avant qu'ils n'atteignent un niveau cytotoxique (Gottesman and Pastan, 1993). La P-gp peut être présente et active dès les premiers traitements de chimiothérapie. Toutefois, les traitements peuvent également entraîner sa surexpression et ainsi augmenter la résistance des tumeurs à un large spectre de médicaments. Ainsi, plusieurs études ont révélé que cette résistance existe avec différents composés hydrophobes, amphipathiques, naturels, incluant la colchicine, la doxorubicine et la vinblastine. Depuis lors, plusieurs autres substrats de la P-gp ainsi que des agents chimiosensibilisants, des agents augmentant la sensibilité aux médicaments chimiothérapeutiques, se sont ajoutés à la liste, tel que résumé dans le tableau 1.1.

**Tableau 1.1** Classes d'agents interagissant avec la P-gp

<u>Médicaments anticancéreux</u>	<u>Agents chimiosensibilisants</u>
-Alcaloïdes de pervenche Vinblastine, vincristine	-Anti-arythmiques Quinidine, amiodarone
-Anthracyclines Mitoxantrone, doxorubicine (adriamycine), daunorubicine	-Bloqueurs de canaux calciques Verapamil, nifedipine, dihydropéridines, azidopine
-Epipodophyllotoxines Etoposide, téniposide	-Antihypertenseurs Résérpine
-Antibiotiques Actinomycine D	-Antibiotiques Céphalosporines hydrophobiques
-Autres Mitomycine, taxol, topotecan, mithramycine	-Antihistaminiques Terfenadine
	-Immunosuppresseurs Cyclosporine A, FK506, rapamycin
	-Hormones stéroïdiennes progestérone
<u>Autres agents cytotoxiques</u>	-Stéroïdes modifiés Tirilazad, Tamoxifène
-Antimicrotubules Colchicine, podophyllotoxine	-Cations lipophiliques Tétraphénylphosphonium
-Inhibiteurs de synthèse protéique Emetine, puromycine	-Diterpènes Forskoline
-Intercalants d'ADN Bromure d'éthidium	-Détergents Tween-80
-Peptides toxiques Valinomycine, gramicidine D, ALLN	-Antidépresseur Tioperidone
	-Antipsychotiques Phénothiazines
	-Plusieurs autres médicaments hydrophobes, amphipatiques et leurs analogues

Ce tableau a été adapté d'après Chin *et al.* (1993) et Gottesman et Pastan (1993).

L'examen attentif des structures chimiques des substrats ne révèle pas de caractéristique chimique commune. Cependant, tous ces composés possèdent des régions hydrophobes et la plupart sont chargés positivement à un pH physiologique (Chin *et al.*, 1993). Les agents chimiosensibilisants ne partagent pas non plus nécessairement d'autres caractéristiques chimiques que leur caractère amphipatique (Gottesman and Pastan, 1993). Ces études qui ont été effectuées sur des lignées cellulaires tumorales exprimant la P-gp, provenant dans certains cas d'animaux, reflète bien, par la grande variété retrouvée dans les substrats, la résistance retrouvée en clinique avec des cas de cancers humains.

### 1.2.2 Implication de la MRP dans la résistance à la chimiothérapie

La P-gp n'est cependant pas la seule protéine impliquée dans la résistance aux médicaments chimiothérapeutiques. Ainsi, une protéine provenant de cellules résistantes à la doxorubicine dérivées d'un carcinome pulmonaire a été identifiée et nommée MRP pour "Multidrug Resistance associated Protein" (Cole *et al.*, 1992). La MRP est une glycoprotéine de type ABC (ATP binding cassette) de 190 kDa ayant peu d'homologie (14%) avec la P-gp (Cole *et al.*, 1992; Krishnamachary and Center, 1993). Elle est fréquemment exprimée dans les gliomes, leur conférant une résistance à plusieurs agents anticancéreux dont la doxorubicine, la vincristine (Abe *et al.*, 1994), le cisplatine et certaines épipodophyllotoxines (Grant *et al.*, 1994). Sa présence a été démontrée dans de nombreux tissus sains dont les glandes surrénales, les poumons, le coeur et le muscle squelettique où elle est fortement exprimée (Flens *et al.*, 1996), ainsi que dans plusieurs types de tumeurs, incluant des carcinomes (Esteller *et al.*, 1995), des neuroblastomes (Bordow *et al.*, 1994) et des leucémies aiguës (Schneider *et al.*, 1995). Son rôle physiologique demeure inconnu mais son haut niveau d'expression dans des cellules ayant des fonctions endocrines suggère un rôle dans le transport des hormones (Flens *et al.*, 1996). Il a d'ailleurs été démontré que le 17 $\beta$ -estradiol-17-( $\beta$ -D-glucuronide), la leukotriène C<sub>4</sub> et plusieurs autres conjugués du glutathion sont transportés par la MRP (Loe *et al.*, 1996a; 1996b)

### 1.2.3 Implication de la LRP dans la résistance à la chimiothérapie

Une protéine cytosolique de 110 kDa impliquée dans la résistance à la chimiothérapie a été récemment identifiée et nommée LRP, pour "Lung Resistance Protein". Tout comme la P-gp et la MRP, la LRP est présente dans de nombreux tissus sains. Elle est fortement exprimée dans les bronches, le tractus digestif, les reins, le cortex

surrénalien, les macrophages et les kératinocytes (Izquierdo *et al.*, 1996a). La LRP est également présente dans de nombreuses tumeurs mais à des niveaux très variables (Izquierdo *et al.*, 1996a). Toutefois, l'expression de la LRP semble représenter un élément fiable pour établir un pronostic dans le cas des patients atteints de carcinomes ovariens ou de leucémie lymphoïde aiguë (Izquierdo *et al.*, 1995; List *et al.*, 1996). La structure et la fonction exacte de LRP demeurent inconnues. Cependant, on sait qu'il s'agit d'une protéine "vault", la particule principale d'une ribonucléoprotéine, un complexe impliqué dans le transport nucléocytoplasmique de diverses molécules (Chugani *et al.*, 1993; Rout and Wentz, 1994). Ces observations ont permis de formuler l'hypothèse que les protéines "vaults" pourraient médier une résistance aux médicaments en contrôlant la redistribution cytoplasmique et le transport nucléocytoplasmique des médicaments (Izquierdo *et al.*, 1996b).

La surexpression de ces trois protéines, P-gp, MRP et LRP, est très variable d'une tumeur à l'autre. Dans certains cas, on peut retrouver une seule des trois protéines mais dans d'autres cas, deux ou même les trois protéines peuvent être exprimées simultanément (Izquierdo *et al.*, 1996c). Il ne semble donc pas y avoir de régulation de l'expression de ces trois protéines l'une sur l'autre.

#### 1.2.4 Autres mécanismes de résistance

D'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la résistance à la chimiothérapie. On retrouve entre autres l'enzyme de réparation de l'ADN (*O*<sup>8</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase), les topoisomérases, les métallothionéines et les glutathion *S*-transférases (GST). La famille des GST comprend trois grandes classes,  $\alpha$ ,  $\pi$  et  $\mu$ . Les formes  $\alpha$  et  $\pi$  (51 et 47 kDa) sont présentes chez tous les sujets humains étudiés tandis que la forme  $\mu$  (53 kDa) est seulement présente chez environ la moitié de la population (Beckett and Hayes,

1993). On retrouve principalement la forme  $\alpha$  au niveau du foie, du pancréas, du rein, de l'estomac, des glandes surrénales et des testicules, la forme  $\pi$  au niveau du rein, des intestins et du placenta (Sundberg *et al.*, 1993) et la forme  $\mu$  au niveau du foie, du muscle squelettique, du cerveau et du coeur (Board *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1987; Mannervick *et al.*, 1992). Les GST détoxifient un large spectre de xénobiotiques tels les herbicides, les pesticides et les agents chimiothérapeutiques dont les alkylants en catalysant leur conjugaison au glutathion réduit (Beckett and Hayes, 1993). Les composés ainsi formés sont expulsés de la cellule par un transport actif dépendant de l'ATP. Le mécanisme exact n'est pas encore clair, mais il semble qu'une protéine de type ABC, appelée pompe GS-X, soit responsable de ce transport. La MRP est une de ces protéines qui peut agir comme une pompe GS-X (Müller *et al.*, 1994). La surexpression des enzymes GST peut s'avérer un mécanisme de résistance à la chimiothérapie puisqu'elle est associée dans certains cas à la résistance aux agents alkylants et à la doxorubicine (Tew, 1994). De plus, certaines lignées cellulaires résistantes à la chimiothérapie surexpriment la GST (Batist *et al.*, 1986).

### **1.3 Analyse moléculaire de la P-glycoprotéine**

#### **1.3.1 Clonage et séquençage de la P-glycoprotéine**

La P-gp a d'abord été clonée par Gros *et al.* (1986a) à partir de l'ADN de lignées cellulaires provenant d'ovaires de hamsters chinois caractérisées par une résistance pléiotropique aux médicaments. Son clonage a par la suite été effectué chez l'humain avec des lignées cellulaires tumorales multirésistantes (Roninson *et al.*, 1986), chez la souris (Martinsson and Levan, 1987; Croop *et al.*, 1989; Devault and Gros; 1990), et plus récemment chez le rat (Deuchars *et al.*, 1992). Dans tous les cas, l'ADN ainsi cloné code pour une protéine d'environ 1280 acides aminés (Gros *et al.*, 1986b). Le clonage a permis de définir des classes de la P-gp. La famille des gènes de la P-gp comporte trois classes de



gènes chez les rongeurs (classes I, II et III) et seulement deux chez l'humain (classes I et III). Il faut toutefois être attentif à la nomenclature qui varie d'une espèce à l'autre, comme on peut l'observer dans le tableau 1.2. Chez l'humain, on retrouve les deux gènes de la P-gp sur le chromosome 7 (Fojo *et al.*, 1986), mais c'est la classe I (MDR1) qui est responsable du phénotype MDR (Roninson *et al.*, 1986; van der Bliek *et al.*, 1988), tandis que chez les rongeurs ce sont les classes I et II (Raymond *et al.*, 1990). Ainsi, la plupart des travaux de recherche sur la P-gp ont été effectués sur les classes I et II. L'homologie entre les classes I et III est supérieure à 70% (Gros *et al.*, 1988) et la classe II est beaucoup plus homologue à la classe I que III (Devault and Gros, 1990). Le degré d'homologie entre les espèces est également très élevé. Par exemple, on retrouve 88% d'identité entre les classes I de l'humain et de la souris (Devine *et al.*, 1991).

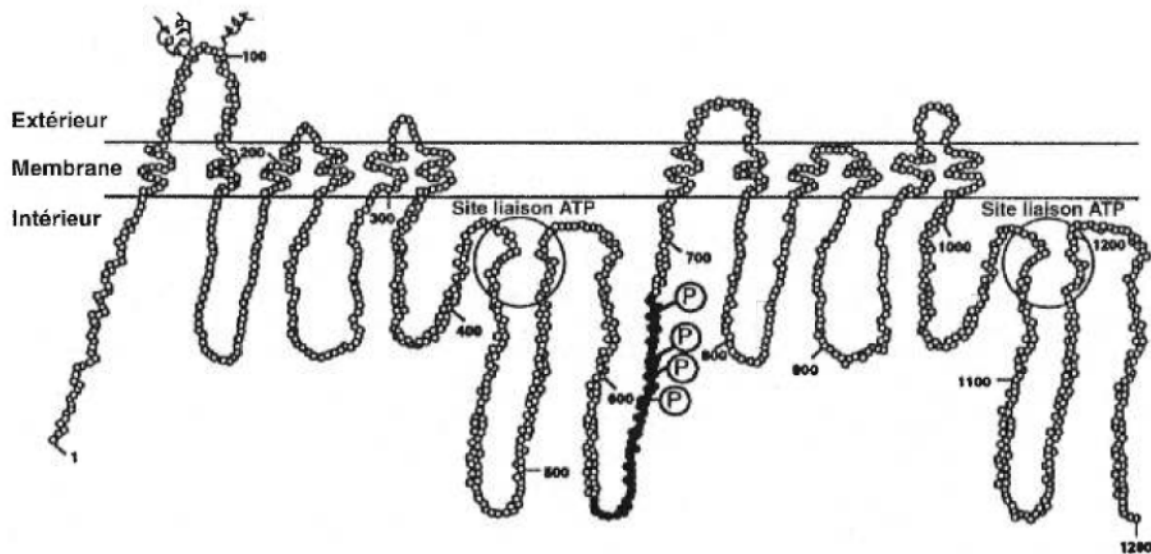
**Tableau 1.2** Famille des gènes de la P-glycoprotéine

Espèces	Classes des gènes de la P-gp		
	I	II	III
Hamster	pgp1	pgp2	pgp3
Souris	mdr3	mdr1	mdr2
Humains	mdr1 (MDR1)	-	mdr3 (MDR2)

Ce tableau a été reproduit d'après Georges *et al.* (1990b).

L'analyse des séquences de la P-gp a permis d'établir un modèle de l'organisation membranaire de la protéine (Figure 1.1) (Gottesman and Pastan, 1988; Georges *et al.*, 1990b). Selon ce modèle, la P-gp comporterait douze segments transmembranaires présents en deux moitiés homologues incluant chacune six domaines transmembranaires, ainsi qu'une boucle cytoplasmique possédant un site de liaison des nucléotides. Les

extrémités N- et C-terminales seraient cytosoliques et il y aurait un site de glycosylation extracellulaire, entre le premier et le deuxième passage transmembranaire.



**Figure 1.1** Modèle de l'organisation de la P-gp humaine dans la membrane plasmique (Germann *et al.*, 1995). Les sites de liaison de l'ATP sont encadrés, les P encadrés indiquent les sérines phosphorylées et la N-glycosylation est représentée par les lignes sinueuses sur la première boucle externe entre le premier et deuxième segments transmembranaire. Les petits cercles pleins (629-687) indiquent la région de liaison entre les deux moitiés de la P-gp.

#### 1.4 Rôle de l'ATP dans la fonction de la P-glycoprotéine

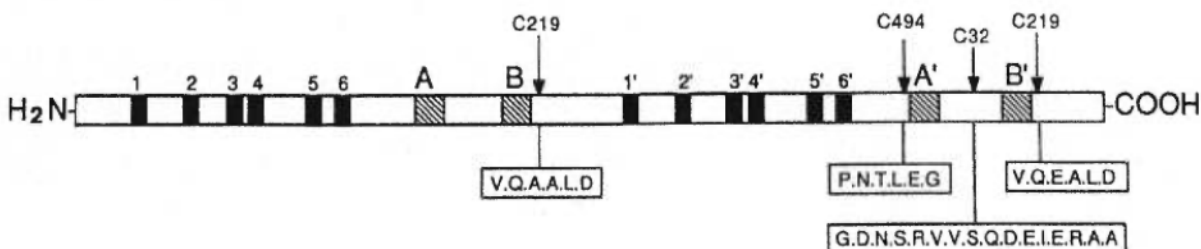
La P-gp est un membre de la superfamille des protéines ABC. Ces protéines sont constituées de deux moitiés, qui comportent chacune six segments transmembranaires et un site de liaison de l'ATP et qui sont liées par un segment hydrophile cytosolique (Kaplan, 1993). Les régions constituant les sites de liaison de l'ATP sont les plus conservées parmi

les protéines ABC et sont considérées comme une caractéristique essentielle de ces protéines (Kuchler and Thorner, 1992).

#### 1.4.1 Identification des sites de liaison de l'ATP

L'analyse de la séquence de la P-gp suggère la présence de deux sites de liaison de nucléotides possédant une grande homologie avec ceux de certaines protéines bactériennes de transport (Gros *et al.*, 1986b; Chen *et al.*, 1986; Gerlach *et al.*, 1986). Des études de mutagenèse dirigée des acides aminés localisés dans les régions de la P-gp susceptibles de lier l'ATP ont identifié quatre acides aminés essentiels pour la fonction de la P-gp. Ainsi, pour *mdr1* de la souris, le changement des résidus glycine aux positions 431 et 1073 pour des résidus alanine ou le changement des résidus lysine aux positions 432 et 1074 pour des résidus arginine inactivent la P-gp (Azzaria *et al.*, 1989). Ces mutations semblent affecter une étape subséquente à la liaison de l'ATP puisque la P-gp pouvait quand même lier la molécule 8-azido-ATP. L'abolition de la fonction de la P-gp par la mutation d'un seul de ces résidus suggère que les deux domaines de liaison nucléotidique peuvent agir coopérativement ou interagir physiquement. Des expériences effectuées avec différents anticorps dirigés contre des épitopes situés près des domaines de liaison des nucléotides renforcent cette hypothèse. En effet, l'incubation de la P-gp avec l'anticorps monoclonal C219 qui reconnaît les deux moitiés N- et C-terminales ou l'anticorps C494 qui reconnaît uniquement la portion C-terminale (Georges *et al.*, 1991) (voir Figure 1.2) affecte la liaison de l'ATP à la P-gp. De plus, la protéolyse limitée a permis de confirmer que les deux moitiés de la P-gp lient l'ATP. Ces études appuient l'hypothèse de coopération entre les deux domaines de liaison des nucléotides, suggérant que malgré leur distance dans la séquence primaire, ces domaines semblent très près l'un de l'autre lorsque la P-gp se retrouve dans la membrane plasmique. Des conclusions similaires ont également été obtenues grâce à des études avec du Mg-8-azido-ATP qui ont permis de mesurer une

stœchiométrie de 2 mol/mol avec un marquage également distribué entre les deux moitiés de la P-gp (Urbatsch *et al.*, 1994; Al-Shawi *et al.*, 1994).



**Figure 1.2 Localisation des épitopes reconnus par trois anticorps monoclonaux.** Sur cette représentation schématique de la P-gp, les douze passages transmembranaires sont indiqués par les rectangles noirs numérotés de 1 à 6 pour la moitié N-terminale et de 1' à 6' pour la moitié C-terminale. Les sites de liaison de l'ATP sont représentés par les carrés hachurés A, B, A' et B'. Les sites reconnus par les anticorps sont indiqués par les flèches et les séquences reconnues sont identifiées à l'intérieur des rectangles. Cette figure est tirée de Georges *et al.* (1990a).

#### 1.4.2 Importance de l'ATP pour la fonction de la P-glycoprotéine

Des études de photomarquage avec le réactif 8-azido- $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]ATP ont clairement démontré que la P-gp lie l'ATP (Cornwell *et al.*, 1987). D'autres travaux ont mis en évidence que l'ATP est nécessaire à la liaison des substrats. Par exemple, l'analyse de la liaison de la [<sup>3</sup>H]vincristine à des membranes plasmiques où la P-gp est fortement exprimée a révélé que l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire à la liaison de la vincristine à la P-gp (Naito *et al.*, 1988). De plus, la présence d'ATP s'est avérée nécessaire pour le transport de molécules substrats par la P-gp, telle la vinblastine. Cette dernière s'accumulait dans

des vésicules en présence d'ATP ou d'un système de régénération de l'ATP mais pas en son absence ou en présence d'un analogue non-hydrolysable de l'ATP (Horio *et al.*, 1988).

La capacité d'hydrolyse de l'ATP de chacune des deux moitiés de la P-gp a été étudiée en exprimant séparément chacune des moitiés dans des cellules Sf9 (Loo and Clarke, 1994). Bien qu'il soit possible de détecter un niveau considérable d'activité ATPasique par l'expression d'une ou l'autre des moitiés, il semble que l'interaction des deux moitiés soit nécessaire pour coupler l'activité ATPasique de la P-gp au transport ou à la liaison de médicaments. L'activité ATPasique peut seulement être stimulée avec la P-gp intacte ou encore lorsque les deux moitiés sont exprimées dans la même cellule (Loo and Clarke, 1994). Une autre approche, utilisant l'entrappement de Mg- ou Co-8-azido-nucléotides par le vanadate, suivi d'une irradiation aux rayons ultra-violet pour photomarquer spécifiquement le domaine nucléotidique inactivé, a également permis d'étudier les sites catalytiques de la P-gp (Urbatsch *et al.*, 1995). Les résultats obtenus concordent avec une activité catalytique des deux moitiés de la P-gp et une coopération entre elles, puisque les deux moitiés de la P-gp étaient marquées en proportion égales, de façon non-sélective et que le marquage de l'un ou l'autre des sites prévenait complètement l'hydrolyse de l'ATP.

#### **1.4.3 Caractérisation de l'activité ATPasique de la P-glycoprotéine**

La liaison de l'ATP et son hydrolyse semblent essentiels pour le transport de substrats, mais le mécanisme par lequel l'hydrolyse de l'ATP et le transport sont couplés demeure inconnu. Cependant, ce couplage permet d'étudier la fonction de la P-gp en analysant son activité ATPasique. Initialement, la purification de la P-gp par chromatographie d'affinité et immunoprécipitation a permis de démontrer que la P-gp possède une activité ATPasique (Hamada and Tsuruo, 1988a; 1988b). Le GTP est lui

aussi hydrolysé par la P-gp mais beaucoup moins efficacement que l'ATP. Cette activité ATPasique est optimale à un pH entre 6,5 et 7,4, est dépendante du magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et est maximale en présence de 0,1-0,2% de 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS). Dans ces conditions, l'activité ATPasique de la P-gp n'est pas affectée par la vincristine et la doxorubicine, mais est stimulée par le verapamil et la trifluoperazine qui inhibent l'efflux des médicaments, suggérant que ces derniers agissent directement sur la P-gp (Hamada and Tsuruo, 1988b).

Des préparations de P-gp partiellement purifiées par deux étapes d'extraction sélective par le CHAPS (Doige *et al.*, 1992) ou par une solubilisation avec de l'octyl glucoside suivie d'une chromatographie avec une colonne de "Reactive Red 120" puis d'une reconstitution dans des protéoliposomes (Urbatsch *et al.*, 1994) ont permis de caractériser l'activité ATPasique de la P-gp. Cette activité est, tout comme celle décrite par le groupe de Tsuruo, optimale à un pH aux environs de 7,4 et dépendante du  $Mg^{2+}$  (Doige *et al.*, 1992; Urbatsch *et al.*, 1994). Elle est inhibée par la daunomycine, la vinblastine et la quinidine et stimulée par le verapamil, la trifluoperazine, la colchicine, la nifedipine et la progesterone (Doige *et al.*, 1992). La protéine catalyse le transport de colchicine dépendant de l'ATP, suggérant que la P-gp fonctionne comme un transporteur actif de médicaments avec une activité ATPasique constitutive (Sharom *et al.*, 1993; Sharom, 1995). Cette hypothèse est renforcée par la reconstitution de la P-gp dans des membranes formées de bicouches de phospholipides (Shapiro and Ling, 1994). Dans ces préparations, où la P-gp représentait environ 90% des protéines, ils ont mesuré une activité ATPasique stimuable par le verapamil et autres agents chimiosensibilisants en plus de quelques médicaments chimiothérapeutiques.

Des études de reconstitution de la P-gp dans des protéoliposomes ont mis en évidence l'importance de la nature des détergents et des lipides pour mesurer l'activité ATPasique. Le CHAPS semble être le meilleur détergent étudié jusqu'à maintenant pour

conserver cette activité (Doige *et al.*, 1993). L'octyl glucoside permet aussi de maintenir l'activité, mais à faible concentration (< 4 mM), tandis que le déoxycholate, la digitonine et le SDS l'inhibent à de très faibles concentrations (100  $\mu$ M). Le Triton X-100 s'avère très particulier puisqu'il stimule l'activité ATPasique à de très faibles concentrations (2-10  $\mu$ M) tandis qu'à concentration plus élevée, il l'inhibe (Doige *et al.*, 1993). Les lipides sont également très importants car certains peuvent stimuler l'activité ATPasique de la P-gp, et ce, en fonction de la dose, alors que d'autres l'inhibent (Sharom *et al.*, 1995). Le degré de saturation des lipides doit également être considéré puisque la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine non-saturées peuvent restaurer l'activité ATPasique de la P-gp solubilisée par des détergents tandis que les formes saturées ne le permettent pas (Doige *et al.*, 1993). Une étude des phospholipides associés à la P-gp purifiée de cellules tumorales a révélé que les deux principaux sont la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine et qu'on retrouve un peu de phosphatidylcholine (Sharom *et al.*, 1995).

#### **1.4.4 Importance des résidus cystéine dans l'activité ATPasique de la P-glycoprotéine**

L'analyse de la séquence de la P-gp montre la présence de sept résidus cystéine au sein de sa structure. Selon le modèle proposé par Gottesman et Pastan (1988), les cystéines 137, 717 et 956 sont respectivement localisées dans le deuxième, le septième et le onzième segment transmembranaire. La cystéine 431 se trouve dans le site de liaison des nucléotides de la moitié N-terminale alors que les résidus cystéine 1074, 1125 et 1227 sont situés dans le site de liaison des nucléotides C-terminal. Les résidus cystéine ne semblent pas nécessaires à la stabilisation de la P-gp dans la membrane puisque la forme mutante, sans résidu cystéine, s'exprime dans la membrane à un niveau similaire à la forme sauvage (Loo and Clarke, 1995a). Ces mutants peuvent même conférer le phénotype de résistance pléiotropique aux médicaments et possèdent une activité ATPasique (Loo and Clarke,

1995b). Cependant, la réintroduction d'un résidu cystéine à la fois a permis de démontrer que la modification covalente par du *N*-ethylmaleimide (NEM) d'un seul résidu cystéine dans les domaines de liaison des nucléotides (cystéine 431 et cystéine 1074) inhibe l'activité ATPasique de la P-gp (Loo and Clarke, 1995b). Ces résultats suggèrent que les deux sites de liaison des nucléotides doivent lier l'ATP pour la fonction de la P-gp. L'inhibition de l'activité ATPasique par la modification des résidus cystéine par le NEM se produit également avec la P-gp de forme sauvage (Doige *et al.*, 1992; Al-Shawi *et al.*, 1994; Shapiro and Ling; 1994; Senior *et al.*, 1995). Ainsi, des agents modificateurs des résidus cystéine pourraient s'avérer des inhibiteurs potentiels de la P-gp et par le fait même diminuer la résistance pléiotropique aux médicaments.

## 1.5 Modifications post-traductionnelles de la P-glycoprotéine

### 1.5.1 Glycosylation de la P-glycoprotéine

L'analyse de la séquence en acides aminés de la P-gp révèle la présence de plusieurs sites de N-glycosylation (Gros *et al.*, 1986b; Chen, *et al.*, 1986; Gerlach *et al.*, 1986; Devault and Gros, 1990). Ce nombre varie de 2 à 4 selon l'espèce, 3 chez l'humain, mais dans tous les cas, ces sites sont situés dans la première boucle extracellulaire (Figure 1.1). L'équipe d'Akiyama a démontré que le précurseur de la P-gp est une protéine de 125 kDa qui est lentement transformée en une protéine mature de 140-150 kDa par glycosylation (Yoshimura *et al.*, 1989; Ichikawa *et al.*, 1991). Le traitement avec de la neuraminidase n'affecte pas la masse moléculaire de la P-gp, suggérant que les chaînes de sucre contiennent très peu d'acides sialiques (Ichikawa *et al.*, 1991). La composition exacte des chaînes de sucres n'est pas encore déterminée mais des études d'incorporation de sucres marqués radioactivement ont démontré la présence de N-acetylglucosamine et de galactose tandis que le mannose et le fructose sont peu incorporés (Richert *et al.*, 1988). Des traitements des précurseurs de la P-gp avec de l'endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H ou de



la forme mature de la P-gp avec de la *N*-glycanase provoquent une diminution de sa masse moléculaire similaire à celle retrouvée dans des cellules traitées à la tunicamycine, indiquant qu'il s'agit presque complètement ou totalement de *N*-glycosylation (Ichikawa *et al.*, 1991). Il semble toutefois que les chaînes de sucres peuvent différer selon le tissu ou selon les tumeurs, puisque la masse moléculaire de la P-gp et sa liaison à différentes lectines varient entre les tissus (Greenberger *et al.*, 1989; Ichikawa *et al.*, 1991). Il faut toutefois considérer que d'autres modifications telles que la phosphorylation et l'acylation peuvent modifier la masse moléculaire de la P-gp.

#### 1.5.1.1 Rôle de la glycosylation dans la fonction de la P-glycoprotéine

L'importance de la glycosylation pour la fonction de la P-gp demeure un sujet controversé. D'une part, certaines études tendent à démontrer que la glycosylation de la P-gp n'est pas nécessaire à l'expulsion des médicaments. Ainsi, la P-gp recombinante exprimée dans des cellules d'insectes, chez *Saccharomyces cerevisiae* ou chez *Escherichia coli* est moins glycosylée ou ne l'est pas du tout et semble conserver une fonction similaire à ses homologues exprimés dans des cellules de mammifères (pour une revue voir Gottesman *et al.*, 1995). Le traitement de lignées cellulaires exprimant la P-gp avec de la tunicamycine pour bloquer la *N*-glycosylation n'affecte pas leur propriété de résistance aux médicaments (Beck and Cirtain, 1982; Ichikawa *et al.*, 1991).

Des mutants défectifs pour les sites de *N*-glycosylation ont été créés (Schinkel *et al.*, 1993). Pour une quantité équivalente de P-gp localisée dans la membrane, ces mutants confèrent les mêmes types et niveaux de résistance aux médicaments que la P-gp glycosylée. Toutefois, la génération de clones résistants avec cette P-gp mutée était très réduite comparativement à la forme de type sauvage glycosylée, car la quantité de P-gp retrouvée dans la membrane était beaucoup plus faible, ce qui suggère que la glycosylation

contribuerait à l'acheminement ou la stabilité de la P-gp dans la membrane plasmique (Schinkel *et al.*, 1993). Des conclusions similaires ont été obtenues récemment avec des cellules traitées à la tunicamycine ou la quantité de P-gp au niveau de la membrane plasmique s'avérait beaucoup moindre (Kramer *et al.*, 1995). Ainsi, il semble que la glycosylation de la P-gp ne soit pas impliquée dans la fonction de transport des médicaments, mais plutôt dans son insertion et/ou sa stabilisation dans la membrane plasmique, une étape nécessaire dans l'expression du phénotype MDR.

### 1.5.2 Phosphorylation de la P-glycoprotéine

La phosphorylation est une modification covalente qui contrôle l'activité de plusieurs protéines. Les réactions de phosphorylation sont catalysées par des protéines kinases qui transfèrent le groupe phosphate terminal ( $\gamma$ ) de l'ATP à des résidus sérine, thréonine ou tyrosine. Malgré que l'analyse de la séquence de la P-gp révèle la présence de nombreux sites consensus de phosphorylation par les protéines kinases dépendantes du calcium (PKC) ou de l'AMP cyclique (PKA) (Kennelly and Krebs, 1991), des analyses biochimiques et génétiques ont démontré que les sérines phosphorylées se retrouvent toutes dans la région cytosolique centrale, d'environ 60 acides aminés, qui lie les deux moitiés homologues de la P-gp (Figure 1.1) (Chambers *et al.*, 1993, 1994; Orr *et al.*, 1993). Des études de mutagenèse dirigée ont clairement démontré que la sérine 661 et la sérine 667 sont phosphorylées *in vitro* par une ou des PKC, dont la PKC $\alpha$  (Chambers *et al.*, 1995). La sérine 683 est également phosphorylée par une ou des PKC mais seulement en absence des autres sites de phosphorylation. La sérine 661 et la sérine 667, mais non la sérine 683, sont aussi phosphorylées par une kinase spécifique à la P-gp appelée kinase V-1 (Chambers *et al.*, 1995). Trois sérines peuvent être phosphorylées par une ou des PKA, soit la sérine 667, la sérine 671 et la sérine 683 (Chambers *et al.*, 1994).

### 1.5.2.1 Rôle de la phosphorylation dans la fonction de la P-glycoprotéine

Le rôle de la phosphorylation dans la résistance multiple aux agents chimiothérapeutiques par la P-gp demeure controversé. Plusieurs études suggèrent que cette modification aurait un rôle dans la résistance, menant à l'hypothèse que la fonction d'expulsion des médicaments pourrait être contrôlée par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation (Center, 1983; Hamada *et al.*, 1987). Différentes lignées cellulaires exprimant la P-gp ont été utilisées pour étudier l'effet des inhibiteurs ou activateurs de protéines kinases sur leur résistance pléiotropique aux médicaments. Plusieurs laboratoires ont démontré que l'ajout d'inhibiteurs de protéines kinases tels la staurosporine et la calphostin C, diminuait la phosphorylation de la P-gp et provoquait une augmentation de l'accumulation des médicaments dans les cellules et diminuait leur résistance (Ma *et al.*, 1991; Chambers *et al.*, 1992; Bates *et al.*, 1993; Drew *et al.*, 1995). Au contraire, l'ajout d'activateurs de protéines kinases tels le 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ou le 4 $\beta$ -phorbol-12 $\beta$ -myristate-13 $\alpha$ -acetate (PMA) augmentait la phosphorylation de la P-gp, diminuait l'accumulation des médicaments et augmentait la résistance des cellules (Hamada *et al.*, 1987; Fine *et al.*, 1988; Chambers *et al.*, 1990; Aftab *et al.*, 1994). Toutefois, les mécanismes d'action de ces inhibiteurs n'étant pas parfaitement élucidé, on ne peut affirmer que cet effet est dû à un effet direct sur la phosphorylation de la P-gp. Par exemple, le TPA augmente l'expression de la P-gp au niveau de la transcription ainsi qu'au niveau de la traduction (Chaudary and Roninson, 1992). Un autre élément à considérer est la liaison potentielle des activateurs ou inhibiteurs des protéines kinases à la P-gp pour ainsi diminuer ou bloquer la fonction de transport de médicaments, ce qui a été démontré avec la staurosporine et ses dérivés (Miyamoto *et al.*, 1992; Wakusawa *et al.*, 1993; Lelong *et al.*, 1994).

D'autres résultats amenant de la controverse face au rôle de la phosphorylation de la P-gp dans le phénomène MDR sont ceux récemment obtenus par l'équipe de Gottesman

(Germann *et al.*, 1996). Ils ont construit des mutants de P-gp où les sérines phosphorylables par les protéines kinases ont toutes été changées pour des résidus alanine, qui ne sont pas phosphorylables, ou pour des résidus acide aspartique afin de simuler des sérines phosphorylées en permanence. Ces mutants, qui n'étaient pas phosphorylés à un niveau détectable, étaient correctement exprimés à la surface cellulaire et conféraient la résistance aux médicaments en diminuant leur accumulation dans la cellule. Ainsi, les mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation ne semblent pas jouer un rôle essentiel dans le phénomène de résistance aux médicaments. Toutefois, ces résultats n'excluent pas la possibilité que la phosphorylation puisse moduler l'activité de la P-gp. Par exemple, la phosphorylation pourrait affecter la spécificité de la P-gp en influençant son affinité pour certains substrats ou elle pourrait influencer la cinétique de transport des substrats tel que suggéré précédemment par cette même équipe (Germann *et al.*, 1995).

## **1.6 Distribution tissulaire de la P-glycoprotéine**

### **1.6.1 La P-glycoprotéine dans les tissus sains**

#### **1.6.1.1 Expression de la P-glycoprotéine dans les tissus**

La P-gp est exprimée dans de nombreux tissus sains. La détermination de sa localisation est une étape qui peut contribuer grandement à l'élucidation de son ou de ses rôle(s). Des études mesurant le niveau d'ARN messager (ARNm) de *mdr1* dans des tissus humains ont démontré que le gène *mdr1* est exprimé à un très haut niveau dans les glandes surrénales, un haut niveau dans le rein, un niveau intermédiaire dans les poumons, le foie, le jéjunum, le colon et le rectum, un faible niveau dans le cerveau et la prostate et un très faible niveau dans la rate, le coeur, le muscle squelettique, l'œsophage, l'estomac, les ovaires, la peau, les tissus sous-cutanés, les lymphocytes et la moelle épinière (Fojo *et al.*, 1987). Un autre groupe a mesuré l'expression de l'ARNm de la P-gp dans différents

tissus chez le hamster (Baas and Borst, 1988). Ils ont eux aussi détecté de la P-gp dans tous les tissus analysés mais à des niveaux d'expression différents de ceux obtenus chez l'humain. L'expression était élevée dans l'œsophage, les testicules et l'utérus, intermédiaire dans le cerveau, les poumons et les ovaires et très faible dans les glandes surrénales, la vessie, la moelle épinière, le cœur, le rein, le foie et la rate (Baas and Borst, 1988).

Des études de distribution de la P-gp ont été également effectuées en regardant directement l'expression de la protéine dans différents tissus humains par immunohistochimie. Une forte expression de la P-gp a d'abord été notée au niveau de cellules épithéliales spécialisées possédant des fonctions de sécrétion ou d'excrétion, soit celles tapissant le tractus gastro-intestinal et celles des tubules proximaux du rein (Thiebaut *et al.*, 1987). Par la suite, la présence de la P-gp a été remarquée dans d'autres cellules épithéliales spécialisées telles celles tapissant la trachée et les bronches majeures des poumons, les glandes sudoripares eccrines, les acini du pancréas, les follicules de la glande thyroïde (Cordon-Cardo, 1991), les glandes mammaires, les glandes de la prostate et les glandes salivaires (van der Valk *et al.*, 1990). Des études d'immunohistochimie ont également permis de démontrer une forte expression de la P-gp au niveau des trophoblastes placentaires, du cortex surrénalien (Sugawara *et al.*, 1988a; 1988b; Cordon-Cardo, 1991) et du foie (van der Valk *et al.*, 1990).

La présence de la P-gp dans différents types de cellules endothéliales a été elle aussi étudiée par immunohistochimie. Dans cette étude, la P-gp a été détectée dans seulement deux tissus, soit le cerveau et les testicules (Cordon-Cardo *et al.*, 1989). Les testicules, tout comme le cerveau, sont considérés comme un sanctuaire pharmacologique, ce qui suggère un rôle physiologique de la P-gp dans la régulation de l'entrée de certaines molécules dans les testicules tout comme il l'a été proposé précédemment pour le cerveau.

### 1.6.1.2 Détermination des classes de P-glycoprotéine

L'analyse de la distribution des ARNm des différentes classes de P-gp chez la souris a démontré que ces gènes ont des patrons d'expression différents selon les tissus (Croop *et al.*, 1989). Le gène *mdr1* (classe II) est principalement exprimé dans l'utérus gravide et dans les glandes surrénales, à un niveau moindre dans le coeur et le rein et à un faible niveau dans le muscle, le cerveau, le foie, la rate et les poumons. Le gène *mdr2* (classe III) se retrouve dans le foie, le muscle et la rate où il représente la majeure partie de l'ARNm de la P-gp ainsi que dans le coeur et les glandes surrénales. Le gène *mdr3* (classe I) est exprimé à un haut niveau dans les intestins, à un niveau intermédiaire dans le cerveau, le coeur et les poumons, à un faible niveau dans le muscle et le rein et à un très faible niveau dans le foie et la rate (Croop *et al.*, 1989).

Des études d'immunohistochimie avec différents anticorps dirigés contre la P-gp ont permis de déterminer la classe de P-gp principalement exprimée dans quelques tissus chez le hamster (Bradley *et al.*, 1990). Les trois anticorps monoclonaux utilisés étaient le C219 qui reconnaît toutes les classes de P-gp, le C32 qui reconnaît les classes I et II et le C494 qui reconnaît seulement la classe I (Bradley *et al.*, 1990; Georges *et al.*, 1990a) (Voir Figure 1.2 pour les séquences reconnues). Les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal, les hépatocytes et les cellules endothéliales du cerveau et des testicules expriment principalement la classe I, le cortex des glandes surrénales et les cellules épithéliales de l'utérus gravide expriment surtout la classe II tandis que la classe III est la prédominante dans les muscles squelettiques et cardiaques (Bradley *et al.*, 1990). À l'exception du foie, ces résultats d'immunohistochimie sont en accord avec les études effectuées sur l'ARN de souris. Une étude de Buschman *et al.* (1992) est venue éclaircir cette ambiguïté au niveau du foie. Des immunobuvardages de type Western avec des anticorps dirigés spécifiquement contre chacune des classes de la P-gp ont démontré que la classe III est

fortement exprimée au niveau des canalicules biliaires du foie. La P-gp de classe I y est aussi exprimée mais plus faiblement (Buschman *et al.*, 1992).

Des études d'immunohistochimie avec l'anticorps monoclonal MRK16 ont permis de déterminer la localisation de la P-gp de classe I chez l'humain (Sugawara, 1990). On l'a observée dans le cortex des glandes surrénales, les capillaires cérébraux et les tubules contournés proximaux du rein (Sugawara, 1990). Une autre étude, utilisant quatre anticorps monoclonaux dirigés contre la P-gp (UIC2, JSB-1, HYB-241 et C-219), a démontré que la P-gp de classe I est aussi exprimée dans les cellules endothéliales des testicules, de la moelle épinière, des intestins, de la vésicule biliaire, des glandes sudoripares de la peau et des trophoblastes (Pavelic *et al.*, 1993). Certains groupes ont rapporté la présence de la P-gp de classe I dans les leucocytes en combinant l'analyse de l'ARN avec des expériences d'immunofluorescence (Klimecki *et al.*, 1994).

La localisation de la P-gp de classe III chez l'humain a également été étudiée par immunohistochimie (Smit *et al.*, 1994). Le seul tissu où la P-gp de classe III a pu être détectée est le foie. Au niveau des glandes surrénales, du coeur, du muscle squelettique et de la rate, où on retrouve l'ARN de la P-gp de classe III, mais à plus faible niveau que dans le foie, aucune détection n'a été possible par immunohistochimie. Cette absence de détection peut être due à une trop faible expression pour les anticorps utilisés (Smit *et al.*, 1994).

### **1.6.1.3 Fonctions possibles des différentes classes de P-glycoprotéine**

La distribution des différentes classes de P-gp est une des premières étapes dans la compréhension des rôles physiologiques de chacune des classes de la P-gp. De plus, la localisation exacte de chacune des classes peut être importante pour établir les stratégies de chimiothérapie dans le traitement du cancer puisque la classe I semble la seule impliquée

dans la résistance aux médicaments. L'expression de la classe I à la surface des cellules épithéliales intestinales, à la surface biliaire des hépatocytes et dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux et testiculaires est en accord avec la suggestion d'une fonction de barrière contre les substances toxiques exogènes et endogènes, ainsi qu'avec la fonction de sécrétion d'hormones et de métabolites (Bradley *et al.*, 1990). Les travaux du groupe de Borst, avec des souris n'exprimant pas la P-gp de classe I, appuient surtout un rôle de protection puisque la P-gp semble limiter l'accumulation d'agents xénobiotiques dans certains tissus et accélérer l'élimination de ces agents (Schinkel *et al.*, 1994; Schinkel *et al.*, 1995b). En fait, l'accumulation de vinblastine, d'ivermectin, de dexaméthasone, de digoxin et de cyclosporine A est augmentée dans les tissus de souris n'exprimant pas la P-gp de classe I. L'accumulation de vinblastine est également augmentée dans des tissus de souris normales lorsque coadministrée avec de la cyclosporine A qui interagit avec la P-gp (Lyubimov *et al.*, 1996).

La discrimination entre les classes de P-gp chez la souris a permis de démontrer que la classe III ne lie pas du tout ou très faiblement des molécules liées par les autres classes, ce qui pourrait expliquer son incapacité à conférer la résistance aux médicaments (Buschman *et al.*, 1992). Cependant, un rôle physiologique a été suggéré pour la P-gp de classe III; elle serait impliquée dans le transport de phospholipides dans la bile (Smit *et al.*, 1993, Ruetz and Gros, 1994; Oude Elferink *et al.*, 1996). De récents résultats suggèrent que la phosphatidylcholine serait le seul type de lipides transportés par la P-gp de classe III (van Helvoort *et al.*, 1996). Ces mêmes travaux suggèrent que la P-gp de classe I serait responsable de la translocation des autres lipides comme la phosphatidyléthanolamine (van Helvoort *et al.*, 1996). Ainsi, les deux classes de P-gp chez l'humain pourraient être impliquées dans l'organisation des lipides, en plus des rôles de protection de l'organisme contre les xénobiotiques proposés précédemment (van Helvoort *et al.*, 1996).



## 1.6.2 La P-glycoprotéine dans les tumeurs

### 1.6.2.1 Expression de la P-glycoprotéine dans les tumeurs

L'expression de la P-gp, associée au phénomène MDR, a été analysée dans de nombreuses tumeurs. Des travaux mesurant le niveau d'expression de l'ARN de *mdr1* ont démontré un haut niveau d'expression dans des tumeurs humaines provenant des glandes surrénales et du colon (Fojo *et al.*, 1987). Ces résultats suggèrent que ce gène peut continuer à être exprimé, ou même être augmenté, lorsque des cellules normales deviennent tumorales (Fojo *et al.*, 1987). Ces travaux démontrent également que l'expression de la P-gp peut être augmentée dans des tumeurs lors de traitements de chimiothérapie, augmentant ainsi la résistance des cellules tumorales aux agents anticancéreux (Fojo *et al.*, 1987).

De nombreuses études d'immunohistochimie sont effectuées pour déterminer l'expression protéique de la P-gp dans des tumeurs. Plusieurs tumeurs humaines dérivant de tissus exprimant la P-gp continuent à l'exprimer telles les adénocarcinomes intestinaux, rénaux et du cortex surrénalien (van der Valk *et al.*, 1990; Flynn *et al.*, 1992). Le maintien d'un haut niveau d'expression de la P-gp dans certaines tumeurs, dont les adénocarcinomes du cortex surrénalien, pourrait être responsable de la faible réponse à la chimiothérapie (Flynn *et al.*, 1992). Certaines tumeurs comme les adénocarcinomes de l'estomac, les lymphomes non-Hodgkiniens et les carcinomes, que ce soit rénal, intestinal, pulmonaire, de la poitrine ou de la vessie, expriment quelquefois la P-gp, mais à des niveaux très variables (Sugawara, 1990; van der Valk *et al.*, 1990; Pileri *et al.*, 1991). D'autres tumeurs comme les lymphomes expriment rarement la P-gp au départ, mais les traitements de chimiothérapie peuvent entraîner son expression (Miller *et al.*, 1991).

### 1.6.2.2 Implication de la P-glycoprotéine dans les tumeurs

L'évaluation de l'expression de la P-gp dans les tumeurs est un des paramètres important dans l'établissement d'un pronostic puisque la résistance aux médicaments peut être la cause d'échec de la chimiothérapie. D'ailleurs, la corrélation entre l'expression de la P-gp et la résistance clinique aux médicaments chimiothérapeutiques a été démontrée dans certains cas de cancers tels les leucémies aiguës lymphoblastiques et myéloïdes (Kuwazuru *et al.*, 1990, Goasguen *et al.*, 1993) et les ostéosarcomes (Baldini *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 1995). De plus, la réponse à la chimiothérapie de tumeurs résistantes, dont des lymphomes, semble être augmentée par la coadministration d'agents modulateurs de la P-gp, tel le verapamil (Miller *et al.*, 1991). Toutefois, ces études sont préliminaires et on ne sait pas si des modulateurs de la P-gp augmenteront significativement la réponse à la chimiothérapie. Cependant, les cyclosporines et particulièrement le dérivé non-immunosuppresseur de la cyclosporine A, le SDZ PSC 833, semblent très prometteurs (pour revue, voir Hegewisch-Becker, 1996).

### 1.6.2.3 La P-glycoprotéine et les tumeurs cérébrales

L'implication de la P-glycoprotéine dans la résistance à la chimiothérapie semble particulière dans le cas des tumeurs cérébrales. En plus de jouer un rôle dans la résistance des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques, elle pourrait restreindre l'entrée des médicaments dans les tumeurs en les expulsant des cellules endothéliales vers la circulation sanguine (Henson *et al.*, 1992). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la P-gp est exprimée dans de nombreuses cellules endothéliales des vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs ainsi que dans quelques cellules de tumeurs cérébrales (Henson *et al.*, 1992; Billson *et al.*, 1994). Par exemple, les gliomes et les méningiomes sont des types de tumeurs qui expriment quelquefois la P-gp au niveau des cellules tumorales et souvent au niveau des cellules endothéliales (Nabors *et al.*, 1991; Tóth *et al.*, 1996). Ces résultats ont également amené la suggestion que la proportion de vaisseaux sanguins exprimant la P-gp

pourrait déterminer le degré de résistance à la chimiothérapie puisque les cellules endothéliales, qui expriment souvent la P-gp, pourraient former une barrière sang-tumeur (Billson *et al.*, 1994).

## **1.7 Implication de la P-glycoprotéine dans la barrière hémato-encéphalique**

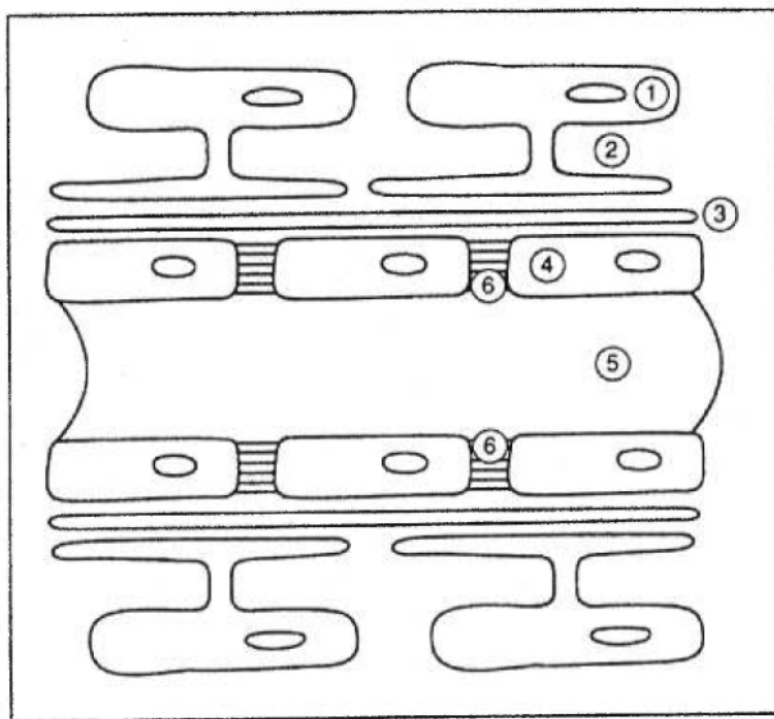
### **1.7.1 Description morphologique de la barrière hémato-encéphalique**

Le cerveau est considéré comme un sanctuaire pharmacologique puisque les médicaments présents dans la circulation systémique ont un accès limité au tissu cervical (Coomber and Stewart, 1985; Goldstein and Betz, 1986). Cette protection est possible grâce aux capillaires cérébraux qui constituent la barrière hémato-encéphalique (voir figures 1.3 et 1.4). Cette dernière est caractérisée par 1) la présence de jonctions serrées (Brightman, 1989); 2) une polarisation des cellules par une localisation asymétrique d'enzymes et de transporteurs (Pardridge, 1986; Vorbrodt, 1988) et 3) l'absence de fenestration et une activité pinocytaire réduite (Reese and Karnovsky, 1967).

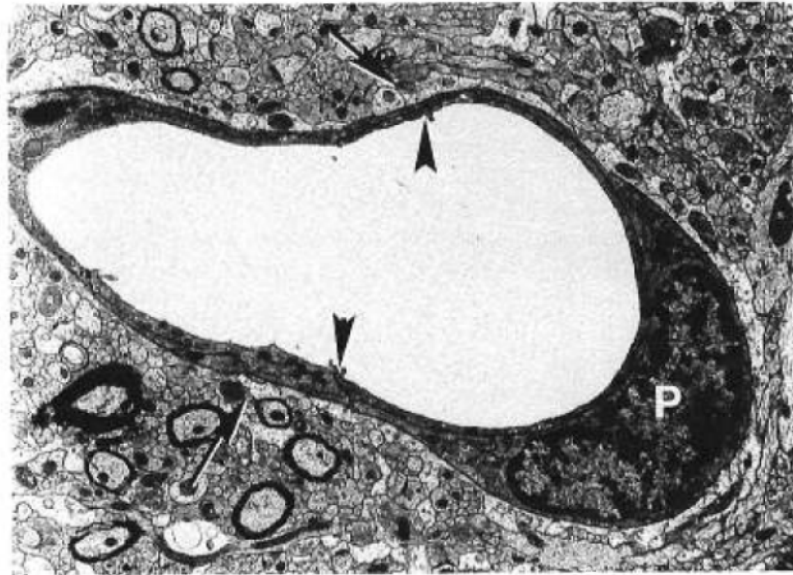
#### **1.7.1.1 Les jonctions serrées**

Les jonctions serrées entre les cellules endothéliales du système nerveux central (SNC) permettent de contrôler la composition du milieu interstitiel des cellules neuronales et gliales qui sont sensibles aux variations de la composition ionique (Brightman and Tao-Cheng, 1993). Les jonctions serrées permettent aux capillaires cérébraux de former une barrière en occluant les fentes entre les cellules endothéliales, empêchant les échanges de solutés (Brightman, 1989; Brightman and Tao-Cheng, 1993). Ces jonctions ne semblent pas être une caractéristique morphologique spécifique aux cellules endothéliales elles-mêmes, elles semblent plutôt induites par un ou des facteurs de l'environnement du SNC (Stewart and Wiley, 1981, Brightman and Tao-Cheng, 1993 pour une revue). Cette

hypothèse s'appuie sur le fait que lorsque des vaisseaux sanguins perméables croissent dans un tissu cervical sans vascularisation, ils développent les caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique. De plus, l'inverse est également vrai, lorsque des capillaires cérébraux croissent dans du tissu mésenchymateux, ils adoptent les caractéristiques de perméabilité du mésenchyme (Stewart and Wiley, 1981). Il est probable que les astrocytes soient les cellules responsables de l'induction des jonctions serrées car l'injection d'une



**Figure 1.3 Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique.** Les cellules endothéliales (4) sont unies par des jonctions serrées (6). Les cellules endothéliales forment une barrière continue séparant le sang (5) du cerveau. Les capillaires cérébraux sont séparés de l'espace extracellulaire cérébral (2) et des cellules gliales (1) par la membrane basale (3). Cette figure est tirée de Boaziz *et al.* (1991).



**Figure 1.4 Micrographie électronique d'un capillaire cérébral.** La lumière est entourée de cellules endothéliales unies par des jonctions serrées indiquées par les têtes de flèches. Les flèches entières pointent des pieds d'astrocytes et la cellule identifiée par P est un péricyte. Cette figure est tirée de Cancilla *et al.* (1993).

suspension d'astrocytes dans la chambre antérieure des yeux de rats forme une aggrégation à la surface de l'iris qui devient vascularisée par des capillaires ayant des propriétés de barrière puisqu'ils sont imperméables au bleu d'Evans (Janzer and Raff, 1987). Des modèles de co-culture suggèrent également que les astrocytes soient responsables des propriétés de la barrière hémato-encéphalique puisque des cellules endothéliales non neuronales développent ces propriétés lorsqu'elles sont cultivées en présence d'astrocytes (Hayashi *et al.*, 1997). Il a été proposé que les jonctions serrées seraient également impliquées dans la barrière sang-cerveau en empêchant la diffusion latérale des protéines de la membrane plasmique, ce qui les confinerait soit du côté luminal, soit du côté anti-luminal (Dragsten *et al.*, 1981).

### 1.7.1.2 Polarisation des cellules endothéliales

La distribution asymétrique de certaines protéines dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux confère une polarité aux cellules, ce qui contribue à la fonction de la barrière hémato-encéphalique (Betz and Goldstein, 1978; Lidinsky and Drewes, 1983). Le système de transport des acides aminés dépendant du sodium, le type A, qui se retrouve seulement du côté anti-luminal et qui peut transporter les acides aminés neutres contre leur gradient de concentration, est un de ces éléments (Betz and Goldstein, 1978). D'autres études de Betz *et al.* (1980) ont démontré que quatre enzymes sont distribués de façon asymétrique. La  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  et la 5'-nucléotidase sont principalement localisées du côté anti-luminal tandis que la phosphatase alcaline et la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, bien que présentes dans les deux membranes, sont principalement localisées du côté luminal. La P-gp est une des protéines qui pourrait contribuer à cette polarisation puisque certains travaux suggèrent qu'elle est située du côté luminal des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Sugawara *et al.*, 1990) et pourrait ainsi contribuer au transport vectoriel de certains composés tel la vincristine (Tatsuta *et al.*, 1992).

### 1.7.1.3 Absence de fenestration et faible pinocytose des cellules endothéliales

D'autres caractéristiques contribuant à la barrière hémato-encéphalique sont la faible activité pinocytaire et l'absence de fenestration des cellules endothéliales, ce qui limite le passage transendothélial. Ces caractéristiques ont été démontrées par des études où des injections intraveineuses de peroxydase du raifort étaient faites à des animaux adultes (Reese and Karnovsky, 1967). Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux se sont

avérées pratiquement imperméables à cette substance puisque suite aux injections, on retrouvait très peu de vésicules endocytiques.

### **1.7.2 Expression de la P-glycoprotéine dans les capillaires cérébraux**

Les capillaires cérébraux sont un des tissus sains où la P-gp est très fortement exprimée (Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Jetté *et al.*, 1993). Ce haut niveau d'expression suggère un rôle très important de la P-gp dans la barrière hémato-encéphalique. La principale isoforme de P-gp exprimée au niveau des capillaires cérébraux est celle de classe I (Schinkel *et al.*, 1994; Jetté *et al.*, 1995a), la même qui est impliquée dans la résistance aux médicaments (Roninson *et al.*, 1986; van der Bliek *et al.*, 1988). Un rôle physiologique suggéré par Cordon-Cardo *et al.* (1989) est une implication dans la régulation de l'entrée de certaines molécules dans le système nerveux central, ce qui pourrait partiellement expliquer l'échec de la chimiothérapie systémique dans l'éradication de tumeurs cérébrales.

#### **1.7.2.1 Fonction dans la protection du cerveau**

De nombreuses études sont effectuées sur des cellules endothéliales de capillaires cérébraux en culture. Plusieurs suggèrent que la P-gp agit activement dans la barrière hémato-encéphalique. L'équipe de Tsuruo a établi plusieurs lignées cellulaires à partir de capillaires cérébraux de souris (Tatsuta *et al.*, 1992). Ces cellules, qui expriment la P-gp du côté apical, semblent agir comme des cellules tumorales exprimant le phénotype MDR. Elles sont résistantes à la doxorubicine et à la vincristine qui est transportée activement hors des cellules. Ce transport est inhibé par la présence de verapamil, un agent chimiosensibilisant qui augmente la sensibilité des cellules à la vincristine ainsi qu'à la

doxorubicine. La P-gp semble donc jouer un rôle direct dans le transport de la vincristine dans ces cellules (Tatsuta *et al.*, 1992).

Des cultures de cellules endothéliales provenant de capillaires cérébraux de boeufs ont permis l'obtention de résultats concordants avec ceux de Tatsuta (Tsuji *et al.*, 1992). L'accumulation de vincristine dans ces cellules est augmentée en présence d'agents chimiosensibilisants tels le verapamil, le diltiazem, la chlorpromazine, la quinidine, la doxorubicine, la testostérone et la progestérone. Des inhibiteurs métaboliques tels le 2,4-dinitrophénol (DNP) et l'azoture de sodium favorisent aussi l'accumulation de vincristine, indiquant une dépendance d'énergie pour l'expulsion de vincristine. L'hypothèse de la participation directe de la P-gp dans cette expulsion a été renforcée par le fait que l'anticorps MRK16, qui reconnaît un épitope externe de la P-gp, augmente lui aussi l'accumulation de vincristine dans ces cellules (Tsuji *et al.*, 1992). Il est possible que la liaison de cet anticorps induise des changements conformationnels des domaines internes de la P-gp, dont le site de liaison des médicaments, ou qu'elle empêche la translocation ou le détachement des médicaments de la P-gp (Tsuji *et al.*, 1992).

D'autres études effectuées avec des cultures de cellules endothéliales provenant de capillaires cérébraux de porcins et de souris montrent que l'accumulation de rhodamine 123, un substrat de la P-gp, est augmentée en présence de verapamil (Hegmann *et al.*, 1992). Ces travaux démontrent également que l'effet cytotoxique de la vincristine est augmentée dans les cellules endothéliales par la présence d'agents chimiosensibilisants tels le verapamil et la cyclosporine A. Cependant, à une même concentration, la cyclosporine A est de 5 à 7 fois plus efficace que le verapamil.

L'ensemble de ces résultats suggère que la P-gp exprimée dans les capillaires cérébraux contribue à la barrière hémato-encéphalique en bloquant l'accumulation de xénobiotiques pour ainsi protéger le cerveau. De ce fait, la liposolubilité des médicaments



n'est pas le seul paramètre déterminant leur entrée dans le cerveau puisque la P-gp semble les expulser activement vers la circulation sanguine avant qu'ils n'atteignent le cerveau, les empêchant ainsi d'atteindre une concentration suffisante pour présenter une cytotoxicité.

### 1.7.2.2 Fonction dans la détoxification du cerveau

Un rôle de la P-gp dans la détoxification du cerveau a été également proposé. La P-gp, en plus de protéger le cerveau en empêchant que des xénobiotiques ne l'atteignent, elle expulserait les toxines présentes dans le cerveau vers la circulation sanguine. Cette hypothèse est basée entre autres sur le transport vectoriel de la cyclosporine A qui s'effectue du côté basal vers le côté apical dans une lignée de cellules endothéliales provenant de capillaires cérébraux de souris (Shirai *et al.*, 1994). L'accumulation de cyclosporine A est environ trois fois moins importante dans ces cellules que dans d'autres lignées cellulaires n'exprimant pas la P-gp. Cependant, cette accumulation est augmentée en présence de verapamil. De plus, le photomarquage de la P-gp avec l' $[^{125}\text{I}]$ iodoaryl azidoprazosin, qui se lie à la P-gp, est inhibé par le verapamil ainsi que par la cyclosporine A, suggérant une interaction directe entre la P-gp et ces deux médicaments. Ces résultats permettent de postuler que le transport vectoriel de la cyclosporine A, du côté basal vers le côté apical des cellules endothéliales, est effectué par la P-gp. Cette dernière pourrait donc être impliquée dans la fonction de barrière hémato-encéphalique contre la cyclosporine A en agissant comme transporteur détoxifiant (Shirai *et al.*, 1994).

L'hypothèse d'interaction directe entre la P-gp et la cyclosporine A est soutenue par plusieurs études dont l'inhibition de ce transport par l'anticorps monoclonal MRK16 qui se lie à un domaine externe de la P-gp (Tsuji *et al.*, 1993). L'accumulation de cyclosporine A est environ trois fois supérieure en présence de l'anticorps alors que la présence d'autres IgG de souris à la même concentration n'a aucun effet (Tsuji *et al.*, 1993). Des travaux

1993). Des travaux avec des capillaires cérébraux isolés de cerveaux de rats démontrent également que la cyclosporine A interagit avec la P-gp (Jetté *et al.*, 1995b). Le photomarquage de la P-gp avec l' [<sup>125</sup>I]iodoaryl azidoprazosin est inhibé par différents composés dont la cyclosporine A et plusieurs de ses analogues non-immunosuppresseurs incluant le SDZ PSC 833. De plus, la P-gp des capillaires cérébraux de rats ou des CHRC5 est photomarkuée par des dérivés photoactivables de la cyclosporine A (Jetté *et al.*, 1995b; Demeule *et al.*, 1997). La cyclosporine A interagit donc directement avec la P-gp au niveau de la barrière hémato-encéphalique.

Tout comme l'efflux de vincristine, le transport de cyclosporine A par la P-gp dans les cellules endothéliales en culture provenant de capillaires cérébraux de boeufs semble dépendant de l'ATP (Tsuji *et al.*, 1993). Lorsque les cellules sont déplétées en ATP par un prétraitement avec du DNP, un inhibiteur métabolique, l'accumulation de cyclosporine A est augmentée d'environ quatre fois (Tsuji *et al.*, 1993). Ces résultats sont en accord avec des travaux effectués avec des lignées de cellules tumorales surexprimant la P-gp où le transport de vinblastine, de vincristine et de doxorubicine médié par la P-gp s'avère dépendant de l'ATP (Horio *et al.*, 1988; Naito *et al.*, 1988; Ohnishi *et al.*, 1995).

La dépendance de l'ATP pour le transport de la doxorubicine par la P-gp a aussi été démontrée *in vivo* (Ohnishi *et al.*, 1995). Des cerveaux de rats ayant subi une ischémie cérébrale de 20 minutes sont 17 fois plus perméables à la doxorubicine qu'en situation normale. Cet effet est réversible puisqu'après un retour à la circulation normale de 24 heures, les valeurs de perméabilité redeviennent normales. Dans un volet *in vitro* de cette étude, utilisant des cellules endothéliales de capillaires cérébraux en culture, l'accumulation de doxorubicine augmente approximativement de deux fois lorsque le niveau d'ATP est diminué de 20% dans les cellules. Ces résultats indiquent que la P-gp fonctionne activement dans la barrière sang-cerveau et peut donc restreindre la perméabilité de composés cytotoxiques (Ohnishi *et al.*, 1995).

D'autres expériences *in vivo* démontrent une participation active de la P-gp dans la barrière hémato-encéphalique. Des travaux de microdialyse intracérébrale ont démontré que la distribution de rhodamine 123 dans le cerveau est influencée par la cyclosporine A (Wang *et al.*, 1995). La distribution plasmatique de rhodamine 123 n'est pas influencée par la cyclosporine A tandis que dans le cerveau, il y a environ trois fois plus de rhodamine 123 lorsqu'il y a coadministration de cyclosporine A. La perfusion *in situ* de rats avec du SDZ PSC 833 ou du verapamil augmente l'accumulation de colchicine et de vinblastine dans le cerveau (Drion *et al.*, 1996). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle important de la P-gp dans la barrière hémato-encéphalique.

Une méthode très intéressante pour étudier le rôle de la P-gp au niveau des capillaires cérébraux est la production de souris viables n'exprimant pas la P-gp de classe I (souris mutantes *mdr1a<sup>-</sup>*) (Schinkel *et al.*, 1994). Le phénotype de ces souris semble normal et elles peuvent même se reproduire, suggérant que l'activité de la P-gp de classe I dans certains tissus n'est pas essentielle à la survie (Schinkel *et al.*, 1995a). Toutefois, ces souris mutantes sont environ 100 fois plus sensibles à l'ivermectine, un pesticide qui est normalement bien toléré par les mammifères. En fait, le niveau d'ivermectine est environ 90 fois plus élevé dans le cerveau des souris sans P-gp de classe I (Schinkel *et al.*, 1994). L'effet de quelques agents xénobiotiques interagissant avec la P-gp a été étudié sur ces souris mutantes. La sensibilité à la vinblastine, un médicament chimiothérapeutique, est augmentée d'environ trois fois chez les souris mutantes. La concentration de vinblastine dans le cerveau de ces souris est environ 20 fois plus élevée que chez les souris normales et elle diminue beaucoup plus lentement (Schinkel *et al.*, 1994). Ces souris sont également plus sensibles à la dexaméthasone, à la digoxine et à la cyclosporine A puisque la concentration dans le cerveau des souris mutantes est augmentée respectivement de 2,5; 35 et 17 fois comparativement à celle des souris normales (Schinkel *et al.*, 1995b). Ces résultats ont amené l'hypothèse d'un rôle de protection et de détoxification du cerveau par

la P-gp qui agirait activement en limitant l'accumulation de xénobiotiques et en les expulsant du cerveau vers la circulation sanguine.

Cette suggestion de détoxification est renforcée par le fait que des souris normales traitées avec le SDZ PSC 833 ou le cyclopeptolide SDZ 280-446, de puissants bloqueurs de la P-gp de classe I, acquièrent une hypersensibilité à l'ivermectine et à la cyclosporine A (Boesch and Loor, 1994, Didier and Loor, 1995). Ainsi, ces deux composés (SDZ PSC 833 et SDZ 280-446), ou d'autres agents bloqueurs de la P-gp, pourraient peut-être permettre des interventions pharmacologiques dans le cerveau, tel le traitement des tumeurs cérébrales, en augmentant la pénétration de médicaments dans ce site (Boesch and Loor, 1994, Didier and Loor, 1995).

### 1.7.2.3 Fonction de sécrétion

Un autre rôle envisagé pour la P-gp au niveau des capillaires cérébraux est son implication dans la sécrétion d'hormones et de métabolites vers le sang (Bradley *et al.*, 1990). Des travaux effectués avec des lignées de cellules épithéliales auxquelles la transfection de *MDR 1* humain a conféré le phénotype MDR et l'expression du côté apical des cellules de la P-gp montrent que ces cellules transportent le cortisol, la dexaméthasone et l'aldostérone du côté basal vers le côté apical des cellules (Ueda *et al.*, 1992). Ce transport vectoriel est respectivement de 8,3; 3,4 et 6,5 fois plus élevé pour le cortisol, l'aldostérone et la dexaméthasone dans ces cellules résistantes que dans celles n'exprimant pas la P-gp. Le transport de ces hormones est inhibé par le verapamil, confirmant que le transport est médié par la P-gp (Ueda *et al.*, 1992).

Le transport de la progestérone a également été étudié, mais l'accumulation de progestérone n'est pas significativement différente entre les cellules transfectées et les cellules épithéliales d'origine humaine (Ueda *et al.*, 1992). Par contre, le transport

transépithélial de cortisol est inhibé par la progestérone et celle-ci sensibilise les cellules chimiorésistantes à la vinblastine. De plus, la progestérone inhibe le photomarquage de la P-gp par l'azidopine et cela, beaucoup plus efficacement et à des concentrations plus faibles, que la testostérone, le cortisol, l'aldostérone et la dexaméthasone. Ces résultats indiquent que la progestérone qui se lie à la P-gp mais qui n'est pas transportée, a une grande affinité pour la P-gp humaine (Ueda *et al.*, 1992). Cette liaison a également été démontrée par Qian et Beck (1990) puisque la P-gp est photomarkuée par la progestérone.

Bien que ces études n'aient pas été effectuées avec des capillaires cérébraux ni des cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux, l'interaction de la P-gp avec les hormones est mise en évidence, appuyant la possibilité d'un rôle de sécrétion d'hormones stéroïdiennes ou d'autres métabolites du cerveau vers la circulation. Ces expériences, ainsi que celles décrites précédemment, démontrent que la P-gp possède un large spectre de substrats potentiels mais avec des affinités variables d'une substance à l'autre.

#### 1.7.2.4 Fonction de transport de peptides

La P-gp est souvent associée à deux autres protéines de la superfamille ABC, soit CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) chez l'humain (Kaplan, 1993) et Ste6 chez la levure (McGrath and Varshavsky, 1989, Kuchler *et al.*, 1989). L'homologie entre la P-gp et Ste6 est de 57% en considérant les substitutions conservatives d'acides aminés (McGrath and Varshavsky, 1989; Kuchler *et al.*, 1989). Contrairement à la P-gp, la fonction physiologique de Ste6 est clairement établie. Ste6 est la protéine, chez la levure, responsable de la sécrétion du facteur a, une phéromone farnésylée de 13 acides aminés qui doit être méthylée pour être transportée (Anderegg *et al.*, 1988; Kuchler *et al.*, 1989). L'homologie entre la P-gp et Ste6 est suffisamment significative pour suggérer que ces deux transporteurs reconnaissent des substrats similaires (Gottesman and Pastan,

1993). Il a donc été suggéré que la P-gp pourrait être impliquée dans la translocation ou sécrétion de peptides ou de protéines à travers la membrane plasmique (Kuchler *et al.*, 1989). Cette hypothèse est appuyée par des études d'activité ATPasique qui ont démontré que plusieurs peptides hydrophobes interagissent avec la P-gp en stimulant l'activité ATPasique et en compétitionnant avec des substrats fluorescents (Sarkadi *et al.*, 1994). D'autres travaux ont même démontré que certains peptides hydrophobes sont transportés par la P-gp (Sharom *et al.*, 1996). De plus, les structures C-terminales des protéines prénylées interagissent avec la P-gp (Zhang *et al.*, 1994). Un autre événement appuyant cette hypothèse est la capacité de la P-gp, lorsque transfectée chez la levure, de médier l'exportation du facteur  $\alpha$ , permettant à la levure de s'accoupler (Raymond *et al.*, 1992).

#### 1.7.2.5 Fonction de canal au chlore

La P-gp présente également des similitudes de structure et de séquence avec le CFTR. Il s'agit d'une autre protéine de la superfamille ABC dont le rôle physiologique est connu. CFTR agit comme un canal au chlore (Anderson *et al.*, 1991; Bear *et al.*, 1992) et une ou des mutations dans ses acides aminés peuvent causer la fibrose kystique (Riordan *et al.*, 1989). Les similitudes de la P-gp avec la protéine CFTR ont suggéré quelques hypothèses pour le rôle physiologique de la P-gp. Il a été suggéré que la P-gp, par une fonction de canal au chlore, soit impliquée dans la régulation des volumes cellulaires dans les tissus où elle est exprimée (Valverde *et al.*, 1992). Cette suggestion est renforcée par le fait que l'expression de la P-gp semble contrôler négativement l'expression de CFTR dans certains tissus (Trezise *et al.*, 1992; Breuer *et al.*, 1993). Cependant, ce rôle de canal au chlore pour la P-gp demeure très controversé. D'une part, certains travaux mettent en évidence que la P-gp peut influencer des canaux au chlore activés par le volume (Valverde *et al.*, 1992; Gill *et al.*, 1992; Valverde *et al.*, 1996) tandis que d'autres démontrent le contraire (Morin *et al.*, 1995; Tominaga *et al.*, 1995; Galiotta *et al.*, 1996). Des études de

transfection ont démontré que des fibroblastes transfectés avec l'ADN complémentaire de *MDRI* humain expriment un canal chlore. Ce canal est activé par des changements de volume cellulaire, est dépendant de l'ATP et est bloqué par des inhibiteurs de la P-gp tels que la forskoline, la 1,9-dideoxy-forskoline, le verapamil, la quinine, la nifedipine et la quinidine (Valverde *et al.*, 1992). Ces données permettent d'envisager que la P-gp, en plus des rôles proposés précédemment, pourrait avoir un rôle dans la régulation des volumes cellulaires des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Il semble toutefois que la P-gp ne peut simultanément se comporter comme un canal chlore et effectuer du transport (Gill *et al.*, 1992).

En résumé, les principaux rôles postulés pour la P-gp au niveau de la barrière hémato-encéphalique sont une fonction de protection en bloquant l'accumulation d'agents xénobiotiques dans le cerveau, de détoxification en expulsant activement les agents cytotoxiques dans la circulation sanguine et de sécrétion, que ce soit d'hormones, de peptides, de protéines ou de métabolites. En plus de ces rôles où la P-gp agit comme un transporteur, une fonction de canal chlore par la P-gp est également proposée dans la régulation des volumes cellulaires. Les fonctions associées au transport d'agents xénobiotiques par la P-gp ont une grande importance clinique puisqu'en bloquant ce transport, des médicaments pour le cancer ou autres maladies pourront atteindre le cerveau. Toutefois, de rigoureux contrôles devront être effectués car ces blocages pourraient entraîner des effets secondaires dommageables.

---

## 1.8 Stratégie de recherche

Le but de ces recherches est de caractériser la P-gp, afin d'obtenir des informations qui pourraient permettre de mieux comprendre sa ou ses fonctions physiologiques. Une

meilleure compréhension pourrait, éventuellement, contribuer à mieux contrôler le phénomène de résistance pléiotropique aux médicaments lors de traitements anti-cancéreux. Cette caractérisation s'est principalement effectuée au niveau des capillaires cérébraux qui forment la barrière hémato-encéphalique. Cette barrière, où la P-gp semble activement impliquée, fait du cerveau un sanctuaire pharmacologique. Ainsi, une caractérisation poussée de la P-gp dans ce tissu s'avère essentielle puisqu'elle est peut-être la cause de nombreux échecs dans l'éradication de tumeurs cérébrales.

### **1.8.1 Réactivité croisée de l'anticorps monoclonal C219 dans les capillaires cérébraux.**

La présence de la P-gp a été démontrée dans de nombreux tissus sains, particulièrement au niveau des capillaires cérébraux où elle est fortement exprimée (Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Jetté *et al.*, 1993). De nombreux travaux, dont ceux de Schinkel *et al.* (1994), qui ont été discutés précédemment, suggèrent une implication pharmacologique de la P-gp dans la barrière hémato-encéphalique. Dans notre laboratoire, une méthode permettant d'isoler les capillaires cérébraux de rats, de souris, de boeufs et d'humains a été mise au point par Dallaire *et al.* (1991). La présence de la P-gp peut être démontrée dans ces capillaires par immunobuvardage de type Western avec l'anticorps monoclonal C219. Cet anticorps reconnaît les épitopes VQAALD et VQEALD (Figure 1.1), des séquences cytosoliques situées près des sites de liaison nucléotidiques et qui sont très conservées parmi les différentes classes de P-gp ainsi que d'une espèce à l'autre. Toutefois, cet anticorps, qui est le plus utilisé en clinique, reconnaît deux protéines dans les capillaires cérébraux, une de 155 kDa (p155) et une de 190 kDa (p190). La première étape du travail expérimental a été de caractériser, par des traitements physico-chimiques, ces deux protéines. Les caractéristiques physico-chimiques de ces deux protéines ont été comparées avec celles de la P-gp des CH<sup>R</sup>C5, des cellules multirésistantes où elle est surexprimée.



Nous pouvons ainsi déterminer laquelle des deux ou si les deux protéines sont la P-gp. Nos résultats démontrent que p155 est la P-gp et que p190 n'est pas reliée au phénomène MDR.

### **1.8.2 Distribution tissulaire de la P-gp par immunobuvardage de type Western**

La plupart des travaux effectués pour déterminer le niveau d'expression de la P-gp dans des tissus sains ou tumoraux utilisent l'immunohistochimie ou le FACS (fluorescence activated cell sorting). La détection de la P-gp par ces méthodes peut être problématique étant donné la possibilité de faux positifs causés par des interactions non spécifiques des anticorps avec des protéines autres que la P-gp. L'anticorps monoclonal C219 réagit avec la myosine, dans le muscle squelettique (Thiebaut *et al.*, 1989), une protéine nommée P-gp<sub>mini</sub> dans des lignées cellulaires multirésistantes (Kawai *et al.*, 1994), une protéine de 65 kDa dans le pancréas (Thévenod *et al.*, 1994) et une protéine de 190 kDa dans les capillaires cérébraux (Beaulieu *et al.*, 1995; Jetté *et al.*, 1995a). Les anticorps monoclonaux JSB-1 et C494 ont eux aussi des réactivités croisées connues. Ils réagissent avec la pyruvate carboxylase de plusieurs espèces (Rao *et al.*, 1994, 1995). L'immunobuvardage de type Western a l'avantage, contrairement aux autres méthodes, de reconnaître les protéines selon leur masse moléculaire, permettant ainsi d'éliminer les faux positifs. La deuxième étape du travail a été d'analyser la distribution tissulaire de la P-gp chez cinq espèces différentes en utilisant les différents anticorps disponibles commercialement qui sont décrits dans le tableau 1.3. L'étude de cinq espèces différentes a permis de comparer l'expression de la P-gp d'une espèce à l'autre en employant la même méthode. La P-gp a été détectée à des niveaux différents dans les membranes isolées de tissus d'humains, de hamsters, de rats, de lapins et de souris. La sensibilité des anticorps est très variable et de nombreuses protéines non-spécifiques sont détectées.

**Tableau 1.3** Anticorps dirigés contre la P-gp ..

Anticorps	Type	Epitope(s) reconnu(s)	Classe(s) et espèces reconnues
C219	Monoclonal (souris)	VQAALD (près du site de liaison de l'ATP C-terminal) et VQEALD (près du site de liaison de l'ATP N-terminal)	Classes I, II et III chez toutes les espèces de cette étude
C494	Monoclonal (souris)	PNTLEG (près du site de liaison de l'ATP C-terminal)	Classe I chez l'humain et le hamster
JSB-1	Monoclonal (souris)	Domaine cytoplasmique près du site de liaison de l'ATP C-terminal	Classe I chez l'humain et le hamster
Ab-1	Polyclonal (lapin)	SALDTESEKVVQEALDK AREG (près du site de liaison de l'ATP C-terminal)	Classe I et possiblement II et III chez toutes les espèces de cette étude

### 1.8.3 Expression luminale de la P-gp dans les capillaires cérébraux

Des études d'immunohistochimie ont suggéré que la P-gp est localisée au niveau de la membrane luminale des capillaires cérébraux (Sugawara *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1994). La troisième étape a consisté à démontrer clairement que la P-gp est très fortement exprimée à ce site. Pour y parvenir, les membranes lumineales des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du cerveau ainsi que du cœur et du poumon ont été isolées par une méthode précédemment mise au point au niveau du poumon par Jacobson *et al.* (1992). Cette méthode consiste à modifier la densité des membranes lumineales avec de la silice colloïdale cationique qui par la suite est recouverte avec un polyanion formant un réseau, permettant leur isolement par centrifugation. L'immunodétection de la P-gp démontre sa présence dans les membranes lumineales des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins des trois tissus. Toutefois, la P-gp s'est avérée être fortement enrichie dans les membranes lumineales des cellules endothéliales du cerveau.

## CHAPITRE II

### MANUSCRITS

- 2.1 P-glycoprotein of blood brain barrier: cross-reactivity of mAb C219 with a 190 kDa protein in bovine and rat isolated brain capillaries.** Beaulieu, E., Demeule, M., Pouliot, J.-F., Averill-Bates, D.A., Murphy, G.F. and Béliveau, R. 1995. *Biochim. Biophys. Acta* 1233, 27-32.
- 2.2 Assessment of P-glycoprotein expression in human and animal tissues by immunoblotting with various antibodies.** Beaulieu, E., Demeule, M., Jetté, L. and Béliveau, R. Soumis à *Biochimica et Biophysica Acta*.
- 2.3 P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain.** Beaulieu, E., Demeule, M., Ghitescu, L. and Béliveau, R. 1997. *Biochem. J.* 326, 539-544.
-

**P-GLYCOPROTEIN OF BLOOD BRAIN BARRIER: CROSS-  
REACTIVITY OF MAb C219 WITH A 190-kDa PROTEIN IN BOVINE  
AND RAT ISOLATED BRAIN CAPILLARIES**

Edith Beaulieu, Michel Demeule, Jean-François Pouliot, Diana A. Averill-Bates, Gérard F. Murphy<sup>δ</sup> and Richard Béliveau\*

Laboratoire de Membranologie and Groupe de Recherche en Biothérapeutique Moléculaire, Département de Chimie-Biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale A, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8, (phone: (514)987-8551, FAX: (514)987-4054)

<sup>δ</sup> Sandoz Canada inc., 385 boul. Bouchard, Dorval, (Québec), H9R 4P5, (phone (514) 631-6775, FAX: (514) 631-3373)

\*To whom all correspondence should be addressed.

**Key words:** P-glycoprotein; brain capillaries; membrane; cancer.

**Abbreviations:** P-gp, P-glycoprotein; BBB, blood brain barrier; MAb, monoclonal antibody; p155, the 155-kDa protein; p190, the 190-kDa protein; MDR, multidrug resistance; PB, Physiological buffer; HM, homogenate medium; TBS-T, Tris buffered saline-Tween 20; PVDF, polyvinylidene difluoride.

**ABSTRACT**

P-glycoprotein (P-gp), an active efflux pump of antitumor drugs, is strongly expressed in endothelial cells of the blood brain barrier (BBB). Two proteins (155 and 190 kDa) were detected by Western blot analysis of beef and rat capillaries with the monoclonal antibody (MAb) C219. In order to characterize the nature of these proteins, their profile of solubilization by different detergents was established and compared with that of P-gp from the CH<sup>R</sup>C5 tumoral cell line. The 155-kDa protein (p155) of capillaries and the P-gp of CH<sup>R</sup>C5 cells were well solubilized by deoxycholate and elugent, whereas the 190-kDa protein (p190) was only solubilized by sodium dodecyl sulphate (SDS). Both proteins have different patterns of extraction by Triton X-114, p155 partitioning as a membrane protein, while p190 was insoluble. Deglycosylation of capillary proteins resulted in a 27-28 kDa decrease in the apparent molecular weight of p155, similar to that observed for the P-gp of CH<sup>R</sup>C5 cells, but a decrease of only 7-8 for p190. Only p155 was immunoprecipitated by MAb C219. These results suggest that only p155 is the P-gp in BBB and that MAb C219 cross-reacts with a 190 kDa MDR-unrelated glycosylated protein. Consequently, the use of this antibody, which is frequently used to detect P-gp in tumors, could be a pitfall of immunohistochemistry screening for cancer tissues and lead to false positive in the diagnosis of MDR.

---

## INTRODUCTION

Multidrug resistance (MDR) constitutes a major obstacle in the clinical treatment of cancer [1]. The overexpression of a membrane glycoprotein of 150-170 kDa [2-4], P-glycoprotein (P-gp), is considered to be the cause of this resistance to multiple chemotherapeutic drugs [5]. P-gp has been cloned from different species including mouse and hamster [6] which possess three gene classes (I, II and III) and from human who has two classes (I and III) [5,7,8]. A model based on its amino acid sequence suggests that P-gp is an integral membrane protein with twelve transmembrane domains. Hydrophilic domains include an external glycosylation site and two internal ATP-binding sites [5,9].

The presence of P-gp has been demonstrated in normal tissues such as adrenal medulla, liver, kidney, colon [10,11] and endothelial cells of brain capillaries [11-13] where it is strongly expressed. Brain capillaries have a unique structure and constitute a selective barrier between blood and brain [14-16]. A recent report showed that P-gp has a pharmacological effect in brain, it limits the amount of drug accumulating [17]. Viable mice with a disruption of the *mdr1a* P-glycoprotein gene have been generated. These chimeric mice presented extreme sensitivity to ivermectin, which was associated with high accumulation of ivermectin in the brain. The absence of *mdr1a* P-gp had also an effect on the pharmacokinetics of vinblastine in the brain, where it was eliminated much more slowly [17].

Among the various antibodies available to detect P-gp in human tumors and in animal studies, MAb C219 is by far the most widely used. MAb C219 recognizes the epitope VQEALD, which is a conserved carboxy-terminal cytoplasmic sequence. The extensive use of this antibody is justified by its high affinity for the three classes of P-gp isoforms identified so far in most species where it was studied, including human, rat, mouse, beef, hamster and cell lines of various origins [2,18]. However, cross-reactivity of MAb C219 have already been reported with a protein of 65 kDa by Western blot and with a

muscular protein by immunohistochemistry [19,20]. In this paper, we present a biochemical characterization of P-gp in purified BBB endothelial cells. A tumoral cell line from chinese hamster ovaries (CH<sup>R</sup>C5) which expresses the MDR phenotype was used as a reference [7,9,21]. Two proteins were immunodetected with MAb C219 in beef and rat brain capillaries. Different physico-chemical treatments were performed to compare these two proteins and determine whether they are related to P-gp. Our results suggest that p155 is P-gp while p190 is MDR-unrelated.

---

## MATERIALS AND METHODS

### *Chemicals*

Dextran T-70 and protein A sepharose 4 fast flow were purchased from Pharmacia LKB Biotechnology (Montréal, Que.). Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Mississauga, Ont.). MAb C219 was a product of ID Labs Inc. (London, Ont.). Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG and enhanced chemiluminescence reagents were obtained from Amersham (Oakville, Ont.). Endoglycosidase F/N-glycosidase F and HEPES were from Boehringer-Mannheim (Laval, Que.). Zwittergent 3-14, hecameg and elugent were products of Calbiochem (La Jolla, CA), Triton X-100 and X-114 and Tween 20 were from Bio-Rad and SDS was from Pierce (Rockford, IL). All the other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

### *Purification of brain capillaries*

Fresh bovine brains were obtained from a local abattoir and transported to the laboratory in ice-cold physiological buffer (PB) composed of 147 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose and 15 mM HEPES/Tris, pH 7.4. Beef brain capillaries were then purified with the procedure of Dallaire et al. [22]. Brain capillaries were also isolated from Sprague-Dawley rats. For both species, the pia mater was removed, and the cerebral cortex was homogenized in 5 volumes of PB with a polytron (Brinkman Instruments, Rexdale, Ont.). The homogenates were mixed with an equal volume of 26 or 31 % (w/v) Dextran T-70 in PB for bovine and rat cortex, respectively. The final pellets were resuspended in PB and stored at -180°C.



### *Isolation of membranes from CH<sup>R</sup>C5 cells*

The CH<sup>R</sup>C5 cells were resuspended in homogenate medium (HM) composed of 50 mM mannitol and 5 mM Hepes/Tris, pH 7.5, homogenized 1 minute with a polytron and centrifuged at 30 000 x g for 20 min at 4°C. The final pellets were resuspended in MH and stored at -80°C.

### *Immunodetection of P-gp*

P-gp was detected by Western blot analysis using MAb C219. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed with a Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad) according to the method of Laemmli [23]. Brain capillaries or CH<sup>R</sup>C5 membrane preparations were resuspended in sample buffer composed of 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 10% glycérol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol and 0.00625% bromophenol blue to a final protein concentration of 0.5 mg/ml. The samples were agitated 30 min at 25°C or heated 3 min at 85°C and loaded on 6.25% acrylamide/bis-acrylamide (29.1:0.9) gels. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 120 V. Proteins were transferred electrophoretically to a 0.45-μm pore size polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a MilliBlot Graphite Electroblotter I apparatus (Millipore, Bedford, MA). The transfer buffer contained 96 mM glycine, 10 mM Tris and 10% methanol. The transfer was carried out for 1h at a constant amperage of 1 mA/cm<sup>2</sup>. Hydrophobic or non-specific sites were blocked overnight at 4°C with 5% powdered skimmed milk in Tris buffered saline (50 mM Tris and 150 mM NaCl) containing 0.3% Tween 20 (TBS-T). Membranes were washed three times for 15 min in TBS. The PVDF membranes were incubated with MAb C219 (200 ng/ml) in TBS-T, 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.05% NaN<sub>3</sub> for 2h at 37°C. Membranes were washed four times for 15 min and incubated 1h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1/2000) in TBS-T containing 2% milk powder. PVDF membranes were washed four times for 10 min in TBS-T, P-gp was detected using chemiluminescence

reagents (ECL). Molecular weights were determined with a calibration curve made with Bio-Rad standards: myosin (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), phosphorylase *b* (97 kDa), bovine serum albumine (66 kDa) and ovalbumine (45 kDa).

#### *Triton X-114 phase partitioning*

Brain capillary proteins (5 mg/ml) were solubilized at 4°C for 30 min in PB containing 2% Triton X-114. The mixture was centrifuged at 100 000 x g for 30 min at 4°C and the pellet was resuspended in PB and 1% SDS. The supernatant was layered over a cushion composed of 1/10 volume of 250 mM sucrose and incubated for 10 min at 30°C. The phase separation was completed by centrifuging the turbid mixture at 2000 x g 5 min at 30°C. The upper detergent-poor phase was separated from the lower detergent-rich phase with a pasteur pipette.

#### *Deglycosylation*

Capillaries and crude membranes from CH<sup>R</sup>C5 cells were resuspended in HM at a protein concentration of 6 mg/ml. Proteins were solubilized 10 min at 25°C in 0.5% SDS. The samples were diluted in HM containing 0.25%  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 2 U/mg protein of endoglycosidase F/N-glycosidase F and protease inhibitors (2  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A and 100  $\mu$ g/ml bacitracin). Deglycosylation was carried out overnight at 25°C. Laemmli's sample buffer was added and Western blot analysis was performed as described above.

---

#### *Peptide synthesis*

The peptide VQEALD was synthesized with an Applied Biosystems synthesizer model 431A (Mississauga, Ont.) using Fmoc (9-fluoronyl-methyloxycarbonyl) chemistry. Peptide purity was verified with a semipreparative HPLC column.

*Immunoprecipitation*

Brain capillaries and membranes from CH<sup>R</sup>C5 cells were washed and resuspended in TBS (pH 7.6) at a protein concentration of 1 mg/ml. SDS (0.5%) was added and the solubilization was carried out for 30 min at 25°C. Samples were diluted (1/5) in TBS containing 1.25% Triton X-100, 0.625% deoxycholate and protease inhibitors, and centrifuged at 14 000 x g for 10 min. MAb C219 (3 µg/ml) was added to the supernatants, and samples were incubated overnight at 4°C. Protein A sepharose equilibrated in TBS containing 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate and 0.1% SDS (RIPA) was added (120 µl/ml). The suspensions were incubated for 1h at 25°C and centrifuged at 8 000 x g for 4 min. Pellets were washed once with RIPA buffer, once with RIPA diluted 1/10 in TBS and twice with TBS. Sample buffer was added to the pellet for SDS-PAGE and western blot analysis as described above.

## RESULTS

Two proteins with apparent molecular weight of 155 and 190 kDa from beef and rat brain capillaries were immunodetected with the MAb C219. The detection of p155 was significantly reduced by heating the samples from both species (Fig. 1). However, p190 was always present with the same intensity, whether the samples were heated or not before electrophoresis.

The two proteins revealed by MAb C219 possess different patterns of solubilization by various detergents. At twice their critical micellar concentrations (CMC), several detergents solubilized very well p155 from brain capillaries (Fig. 2). Deoxycholate, an anionic detergent, and elugent, a mixture of non-ionic detergents, were the most effective in solubilizing p155 (Fig. 2). These detergents also efficiently solubilized P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells (Table I). In contrast, p190 was extracted only by SDS (Table I) and by urea (results not shown).

Triton X-114 phase partitioning is a method used to separate the proteins according to their solubilization by Triton X-114 [24] and it allows to evaluate the degree of hydrophobicity of proteins [25]. Fractionation of beef and rats brain capillary proteins with Triton X-114 showed that the two proteins detected by MAb C219 partitioned in different phases (Fig. 3). P155 was extracted by Triton X-114 and partitioned in the detergent-rich phase, while p190 was completely insoluble in Triton X-114 and remained in the first pellet. The fractionation profile of p155 and p190 was identical for beef and rat capillaries.

Both brain capillary proteins detected with MAb C219 are glycoproteins since both proteins had a different profile of migration after endoglycosidase F/N-glycosydase-F treatment (Fig. 4). The difference in migration rate is greater for p155 (27-28 kDa) than for p190 (7-8 kDa). The shift in the apparent molecular weight of p155 from capillaries was similar to that obtained for the P-gp of CH<sup>R</sup>C5 cells after the same deglycosylation treatment.

Competition studies with the VQEALD peptide have shown that the detection, with MAb C219, of p155 and P-gp from CHRC5 cells is displaced at a lower peptide concentration than that of p190 kDa (Fig. 5). The binding of MAb C219 to the P-gp of CHRC5 cells and to p155 is completely inhibited by 10 mM peptide. At the same peptide concentration, however, binding of MAb C219 to p190 was inhibited only by 45%.

Immunoprecipitation of brain capillary proteins with MAb C219 revealed that only p155, but not p190, is immunoprecipitated (Fig. 6).

---

## DISCUSSION

Two protein bands of comparable intensity were detected by Western blot analysis of brain capillaries using MAb C219. The physicochemical characteristics of these two proteins (190 and 155 kDa) were strikingly different. First, in contrast with p190, p155 from BBB presented a high sensitivity towards heat treatment. P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells was also sensitive to heat treatment [26]. Second, extraction of brain capillary proteins with a variety of detergents indicated that the two proteins detected by MAb C219 showed different patterns of solubilization. The detergents that solubilized efficiently p155 from brain capillaries also solubilized P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells. P190 behaved very differently since SDS was the only detergent that solubilized it. Urea (8 M) was the only other agent able to extract p190. Third, comparison of the hydrophobic properties by phase partitioning of the two proteins showed a strong difference. P155 partitioned in the detergent-rich phase and behaved like a membrane protein. In contrast, p190 was insoluble in Triton X-114. It is possible that p190 is a cytoskeleton associated protein since it was only solubilized by SDS and urea. The cytoskeleton is often experimentally defined as the insoluble residue remaining when cells are extracted with a non-ionic detergent [27]. Fourth, p155 and p190 reacted very differently to the N-deglycosylation treatment. P155 was more strongly affected in its migration pattern than p190. Fifth, lower concentration of the VQEALD peptide were required to abolish the binding of MAb C219 to p155 and to P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells than to p190. Finally, among brain capillary proteins, only p155 was immunoprecipitated by MAb C219.

A cross-reactivity of MAb C219 to other membrane protein was recently reported [19]. A protein of approximately 65 kDa was immunodetected by MAb C219 in the drug resistant cell lines, P388/ADR and P388/VCR-600. This protein seemed MDR-related and was called mini-P-glycoprotein. However, contrarily to P-gp, P-gp<sub>mini</sub> was not N-glycosylated neither phosphorylated at serine or threonine residues [19]. MAb C219 was

also found to react immunohistochemically with striations in fast-twitch fibers in skeletal muscle [20].

A multidrug resistance associated membrane protein of 190 kDa (MRP) gene is overexpressed in adriamycin resistant HL60 cells. However, the *mdr1* gene is not overexpressed in these cells and the level of P-gp is not detectable [28]. MRP, which binds ATP, presents a very small sequence homology with P-gp, since cross-reactivity of some antibodies against MRP is observed with P-gp [29]. However, the epitope recognized by MAb C219 is absent from the deduced amino acid sequence of MRP. These results suggest that p190 detected by MAb C219 in brain capillaries is not MRP.

In the present study, two proteins (p155 and p190) were revealed by Western blot analysis of brain capillaries with MAb C219. The results suggest that p155 is P-gp. However, cross reactivity was observed between MAb C219 and a glycoprotein of 190 kDa, probably unrelated to MDR. So, MAb C219, which is frequently used to demonstrate the presence of P-gp in tumor samples, also reacts with a distinct protein which could lead to false positive in the diagnosis of MDR in tumors.

---

## **ACKNOWLEDGMENTS**

Special thanks are given to Dr. Vincent Vachon for his critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and by Sandoz Canada.

---



**REFERENCES**

1. Pastan, I. and Gottesman, M.M. (1987) *N. Engl. J. Med.* 316, 1388-1393.
2. Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G. and Ling, V. (1985) *Nature* 316, 820-823.
3. Juliano, R.L. and Ling, V. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152-162.
4. Endicott, J.A. and Ling, V. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137-171.
5. Georges, E., Sharom, F.J. and Ling, V. (1990) *Adv. Pharmacol.* 21, 185-215.
6. Endicott, J.A., Juranka, P.F., Sarangi, F., Gerlach, J.H., Deuchars, K.L. and Ling, V. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 4075-4081.
7. Marie, J.P. (1990) *Médecine/Science* 6, 443-448.
8. Van der Blik, A.M., Baas, F., Ten Houte de Lange, T., Kooiman, P.M., Van der Velde-Koerts, T. and Borst, P. (1987) *EMBO J.* 6, 3325-3331.
9. Kartner, N. and Ling, V. (1989) *Sci. Am.*, March 1989, 44-52.
10. Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M. and Pastan, I. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 265-269.
11. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. and Bertino, J.R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 695-698.
12. Tsuji, A., Terasaki, T., Takabatake, Y., Tenda, Y., Tamai, I., Yamashima, T., Moritani, S., Tsuruo, T. and Yamashita, J. (1992) *Life Sci.* 51, 1427-1437.

13. Jetté, L., Têtu, B. and Béliveau, R. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1150, 147-154.
14. Reese, T.S. and Karnovsky, M.J. (1967) *J. Cell Biol.* 34, 207-217.
15. Brightman, M.W. (1977) *Exp. Eye Res.* 25 (Suppl. 1), 1-25.
16. Algers, G., Karisson, B. and Sellström, A. (1986) *Neurochem. Res.* 11, 661-670.
17. Schinkel, A.H., Smit, J.J.M., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., van derValk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P.J., Berns A.J.M. and Borst P. (1994) *Cell* 77, 491-502.
18. Georges, E., Bradley, G., Gariépy, J. and Ling, V. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 152-156.
19. Kaway, K., Kusano, I., Ido, M., Sakurai, M., Shiraishi, T. and Yatani, R. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 2, 804-810.
20. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. and Willingham, M.C. (1989) *Histochem. Cytochem.* 37, 159-164.
21. Kartner, N., Riodan, J.R. and Ling, V. (1983) *Science* 222, 1285-1288.
22. Dallaire, L., Tremblay, L. and Béliveau, R. (1991) *Biochem. J.* 276, 745-752.
23. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
24. Bordier, C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1604-1607

---

25. Vachon, V., Pouliot, J.F., Laprade, R. and Béliveau, R. (1990) *Biochem. Cell Biol.* 69, 206-211.
26. Greenberger, L.M., Williams, S.S., Georges, E., Ling, V. and Horwitz, S.B. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 506-510.

27. Sheng, Z., Vanderpuye, O.A., Hull, S.R., Carraway, C.A. and Carraway, K.L. (1989) *J. Cell. Biochem.* 40, 453-466.
  28. Marquardt, D., McCrone, S. and Center, M.S. (1990) *Cancer Res.* 50, 1426-1430.
  29. Krishnamachary, N. and Center, M.S. (1993) *Cancer Res.* 53, 3658-3661.
-

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** *Detection of P-gp from brain capillaries.*

Proteins (10  $\mu$ g) from beef (B) and rat (R) were heated 3 min or solubilized 30 min at room temperature before SDS-PAGE. Proteins were transferred onto PVDF membranes and analyzed by Western blot with MAb C219 as described in the Materials and Methods section.

**Figure 2.** *Solubilisation of P-gp from brain capillaries.*

Brain capillary proteins (0.5 mg/ml) from rat were solubilized 30 min at 25°C in homogenate medium with the following detergents: 0.4% deoxycholate (D), 0.1% Zwittergent 3-14 (Z), 1.2% CHAPS (C), 1.4% n-octyl-glucoside (O), 1.3% hecameg (H) et 1.5% elugent (E). Proteins (10  $\mu$ g) from supernatants (S), pellets (P) and untreated capillaries (Cap) were resolved by SDS-PAGE and detected by Western blot analysis.

**Figure 3.** *Phase partitioning of brain capillary proteins with Triton X-114.*

Brain capillary proteins (lane 1) from beef (A) and rats (B) were solubilized in 2% (w/v) Triton X-114. After a 30 min centrifugation at 100 000 x g, these were separated into pellet (lane 2) and supernatant (lane 3) fractions. Phase separation of the latter gave a detergent-poor (lane 4) and a detergent-rich phase (lane 5). The proteins from each fraction were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot analysis.

**Figure 4.** *Deglycosylation of brain capillary and CH<sup>R</sup>C5 membrane proteins.*

Solubilized proteins from rat (RAT) and CH<sup>R</sup>C5 crude membranes (CH<sup>R</sup>C5) were incubated with (+) and without (-) endoglycosidase F/N-glycosidase F as described in the Materials and Methods section. Electrophoresis and immunodetection with MAb C219

were described as mentioned previously. Untreated capillary or CH<sup>R</sup>C5 cells are also shown (C).

**Figure 5.** *Inhibition of MAb C219 binding by peptide VQEALD.*

Western blot analysis of the rat brain capillary proteins p155 (▲), p190 (●) and CH<sup>R</sup>C5 membranes (■) were performed as described in the Materials and Methods section with the addition of peptide to the primary antibody incubation medium.

**Figure 6.** *Immunoprecipitation of brain capillary proteins and P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells with MAb C219.*

Solubilized proteins from rat brain capillaries (CAP) and CH<sup>R</sup>C5 cells (CH<sup>R</sup>C5) were immunoprecipitated with MAb C219 as described in the Materials and Methods section. Total (T), and the immunoprecipitated proteins (P) were separated by SDS-PAGE and Western blot analysis performed as described previously.

---

**TABLE I**

*Solubilisation of P-gp from the membrane of CH<sup>R</sup>C5 cells and proteins from brain capillaries detected with MAb C219.*

Proteins from rat brain capillaries (5 mg/ml) and CH<sup>R</sup>C5 cells were solubilized with different detergents 60 min at 25°C and immunodetected with MAb C219 as described in the Materials and Methods section. Autoradiograms were scanned with an LKB Ultrosan XL enhanced laser densitometer and the relative area under each peak was calculated. Data shown represent the percentage of solubilization compared to the control.

Detergent (concentration)	% solubilization		
	P-gp from CH <sup>R</sup> C5 cells	p155	p190
SDS (0.5%)	95	80	48
Hecameg (1.3%)	84	31	0
Octylglucoside (1.4%)	82	15	0
Elugent (1.5%)	81	90	0
Zwittergent 3-14 (0.1%)	81	34	0
Deoxycholate (0.4 %)	78	88	0
CHAPS (1.2%)	75	30	0

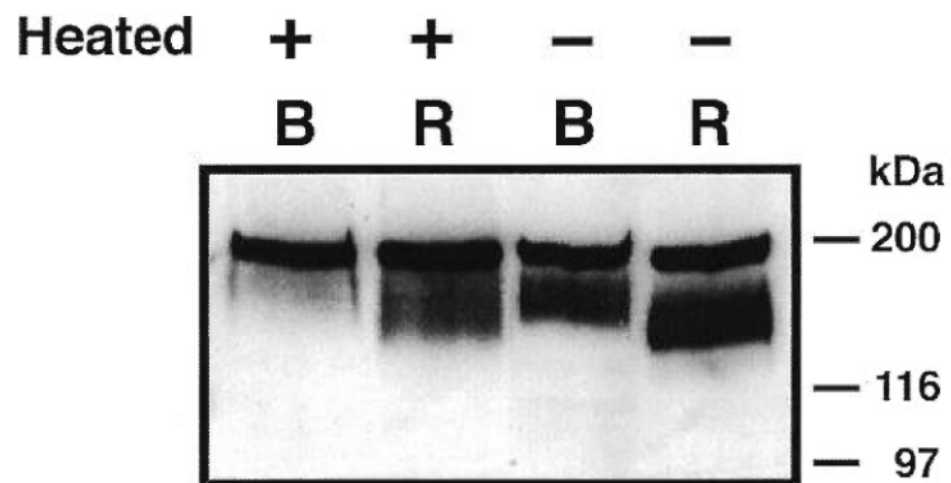


Figure 1. Detection of P-gp from brain capillaries.

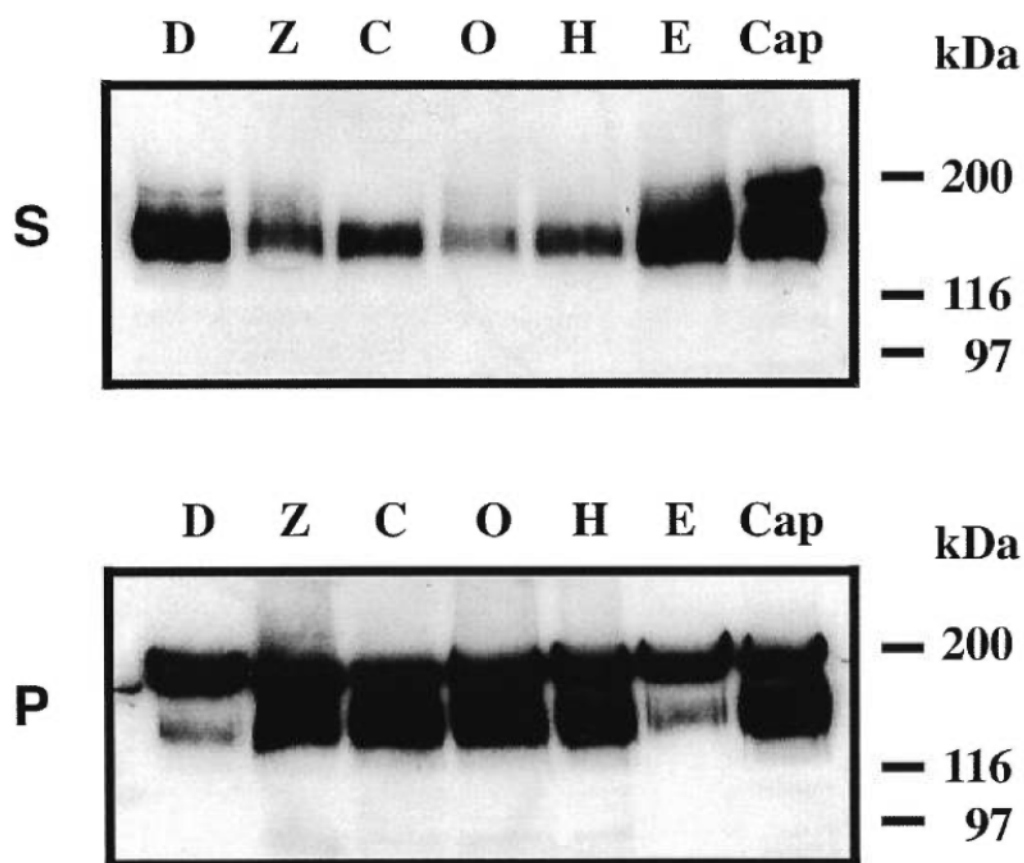


Figure 2. Solubilisation of P-gp from brain capillaries.



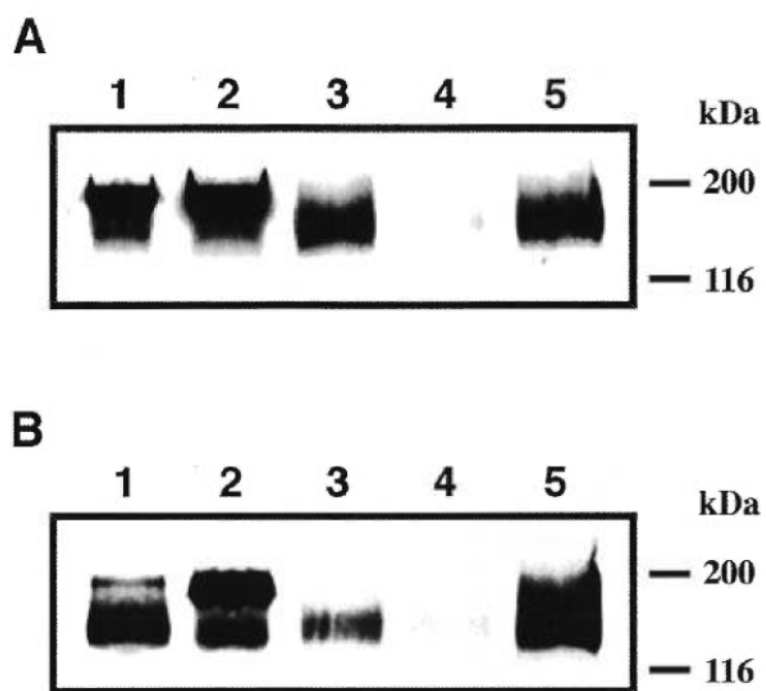
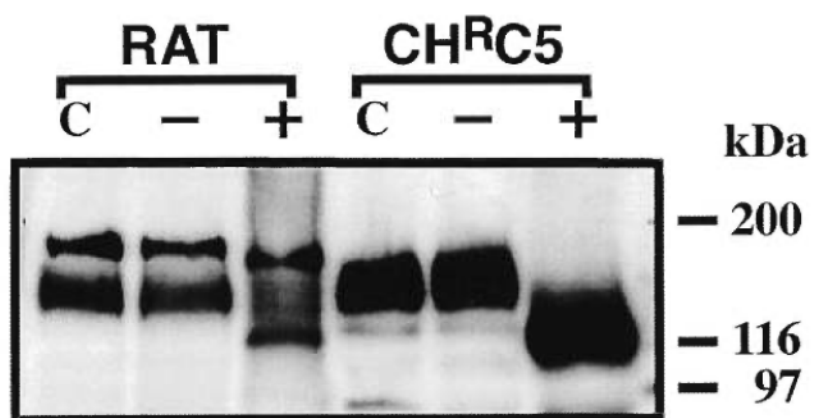


Figure 3. Phase partitioning of brain capillary proteins with Triton X-114.



**Figure 4. Deglycosylation of brain capillary and CHRC5 membrane proteins.**

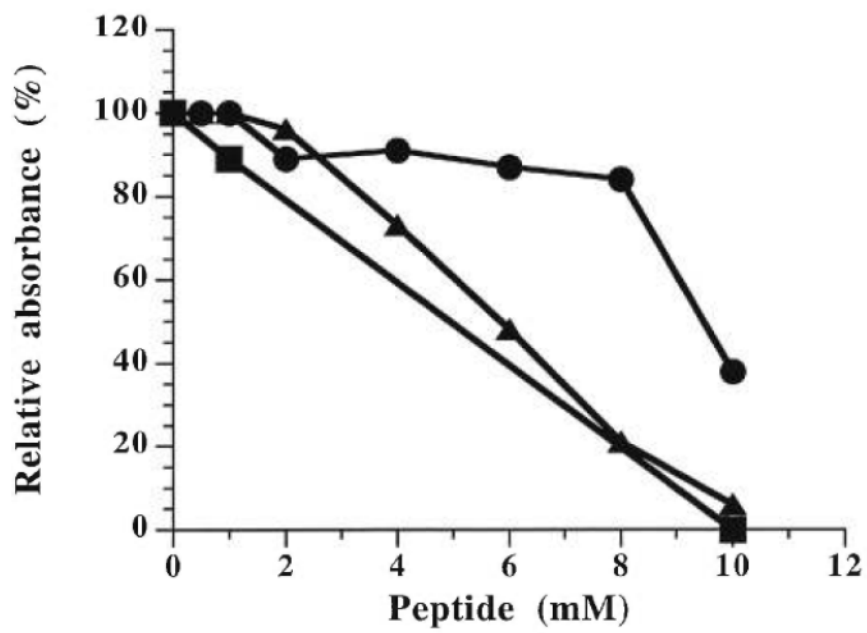
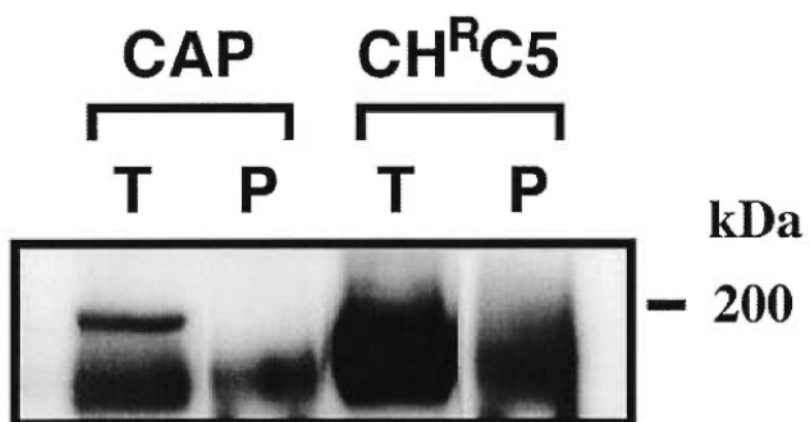


Figure 5. Inhibition of MAb C219 binding by peptide VQEALD.



**Figure 6. Immunoprecipitation of brain capillary proteins and P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells with MAb C219.**

**ASSESSMENT OF P-GLYCOPROTEIN EXPRESSION IN HUMAN  
AND ANIMAL TISSUES BY IMMUNOBLOTTING WITH VARIOUS  
ANTIBODIES**

Edith Beaulieu, Michel Demeule, Lucie Jetté and Richard Béliveau\*

Laboratoire d'oncologie moléculaire, Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8 (phone: (514) 987-3000 ext. 8551, FAX: (514) 987-4054)

\*To whom all correspondence should be addressed.

**Key words:** P-glycoprotein; distribution; membrane; cancer.

---

**Abbreviations:** BBM, brush border membranes; ECL, enhanced chemiluminescence; HM, homogenate medium; mAb, monoclonal antibody; MDR, multidrug resistance; pAb, polyclonal antibody; PB, physiological buffer; P-gp, P-glycoprotein; PVDF, polyvinylidene difluoride; TBS-T, Tris buffered saline-Tween 20.

**Abstract**

The distribution of P-glycoprotein (P-gp), an active efflux pump of antitumor drugs, was studied in membranes isolated from human, hamster, rat, rabbit and mouse tissues by Western blot using three monoclonal antibodies (mAb) (C219, C494 and JSB-1) and one polyclonal antibody (pAb) (Ab-1). In all five species, P-gp was detected with mAb C219 in all tissues (intestine, liver, spleen, kidney, testis, heart, thymus, lung, skeletal muscle, brain and stomach) except pancreas. PAb Ab-1 showed the presence of P-gp in intestine, liver, kidney, testis, heart, lung and brain. MAb C494 revealed the presence of P-gp only in CH<sup>R</sup>C5 cells whereas mAb JSB-1 detected P-gp only in kidney. However, all these antibodies cross-reacted with proteins unrelated to P-gp, especially in mouse and hamster tissues. MAb C219 was also used to evaluate P-gp expression in human tumors. P-gp was expressed in some tumors and cross-reactive proteins were present in many of them. These results show clearly that these cross-reacting antibodies could lead to false positive results when immunohistochemistry or fluorescence activation cell sorting are used for diagnosis of multidrug resistance, since these methods do not discriminate P-gp from these cross-reacting proteins.

---

## Introduction

A major obstacle to the clinical treatment of cancer is the multidrug resistance (MDR) phenomenon. MDR is associated with the overexpression of P-glycoprotein (P-gp) [1,2], an integral membrane protein which pumps drugs out of the cell [3,4]. Three classes of P-gp exist in rodents (I, II and III) and two in humans (I and III) [4].

P-gp has been detected immunohistochemically in several normal tissues including kidney, adrenal cortex, pancreas, liver, intestine [5], testis and brain capillaries where it is strongly expressed [6-8]. Brain, skeletal muscle and heart express class I isoform of P-gp where its action limits the intracellular accumulation of some drugs such as ivermectin and vinblastine [9]. This function is in agreement with the previous suggestion of a protective role [10]. The class III P-gp, which is not involved in multidrug resistance, is present in liver where it is involved in the secretion of phosphatidylcholine in bile [11-13].

Most studies aimed at characterizing P-gp expression in different tissues have involved immunohistochemistry or fluorescence activation cell sorting. Detection of P-gp by these methods may be problematic because of false positives caused by non-specific interaction of the antibodies with proteins other than P-gp. The monoclonal antibody (mAb) C219 cross-reacts with other proteins such as 1) an unrelated skeletal muscle protein [7], 2) a 65-kDa protein, called P-gp<sub>mini</sub>, in the drug-resistant cell lines P388/ADR and P388/VCR-600 [14], 3) a 65-kDa protein in pancreatic zymogen granule membranes [15], and 4) a 190-kDa protein in rat and beef brain capillaries [16]. The mAbs C494 and JSB-1 cross-react with pyruvate carboxylase from liver in several species [17,18]. Since mAb C219 is the most widely used antibody among the various antibodies available to detect P-gp in human tumor tissues and clinical tests are made by immunohistochemistry, false positives in the diagnosis of MDR phenomenon could be a major problem. Western blot detection which identifies the antigen according to its size, presents a clear methodological advantage over these methods by eliminating these false positives. It is important, in a clinical context, to identify unambiguously the MDR phenotype, for a treatment with

chemosensitizers, aimed directly at neutralizing P-gp. To evaluate the use of various available antibodies, P-gp expression in tissues from five different species was determined by Western blot analysis. P-gp was found at various levels in membranes isolated from different human, hamster, rat, rabbit and mouse tissues. The sensitivity and specificity of these antibodies were strikingly different and many proteins, in addition to P-gp, were detected.

---



## Materials and Methods

### *Chemicals*

Dextran T-70 and fast flow protein A sepharose were purchased from Pharmacia LKB Biotechnology (Montreal, Que.). Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Mississauga, Ont.) and SDS, from Pierce (Rockford, IL). MAbs C219, C494 and JSB-1 were products of ID Labs Inc. (London, Ont.). PAb Ab-1 was purchased from Oncogene Science (Uniondale, NY). Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were obtained from Amersham (Oakville, Ont.) and Hepes, from Boeringher-Mannheim (Laval, Que). All other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

### *Preparation of crude membrane fractions from various tissues*

Intestine, liver, spleen, kidney, testis, pancreas, heart, thymus, lung, skeletal muscle, brain and stomach were removed from deceased humans (except thymus and stomach), hamsters, rats, rabbits (except thymus) and mice, and washed immediately in cold 0.85% NaCl. The tissues were homogenized in 8 volumes of 250 mM sucrose and 5 mM Hepes/Tris, pH 7.5, with a polytron (Brinkman Instruments, Rexdale, Ont.). The homogenates were centrifuged at  $3\ 000 \times g$  for 10 min at 4°C and the supernatants were centrifuged at  $33\ 000 \times g$  for 30 min. The final pellets were resuspended in 50 mM mannitol, 20 mM Hepes/Tris, pH 7.5, and stored at -80°C. The same procedure was used with human tumors obtained from the Hôpital Ste-Justine.

### *Purification of brain capillaries*

Brain capillaries were isolated from male Sprague-Dawley rats, male or female C57BL/6 mice and male humans with the procedure of Dallaire et al. [19]. The pia mater

was removed and the cerebral cortex was homogenized in 5 volumes of ice-cold physiological buffer (PB) composed of 147 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose and 15 mM Hepes/Tris, pH 7.4, with a polytron. The homogenates were mixed with an equal volume of Dextran T-70 in PB (26% (w/v) for bovine and human cortex and 31% for rat and mouse cortex). The final pellets were resuspended in PB and stored at -180°C. The enrichments were evaluated from  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase enzymatic activity. Brain capillary fractions were about 10-fold more active than homogenates.

#### *Isolation of crude membrane fraction from CH<sup>R</sup>C5 cells*

CH<sup>R</sup>C5 cells, kindly provided by Dr Diana A. Averill-Bates, were resuspended in homogenate medium (HM) composed of 50 mM mannitol and 5 mM Hepes/Tris, pH 7.5, homogenized 1 min with a polytron and centrifuged at 30 000 × g for 20 min at 4°C. The final pellets were resuspended in HM and stored at -80°C.

#### *Isolation of brush-border membrane from human kidney*

Brush-border membranes (BBM) were prepared from human kidney cortex with an MgCl<sub>2</sub> precipitation method [20] with slight modifications. The cortex was homogenized with a polytron and a single step of MgCl<sub>2</sub> precipitation was performed. Enrichment of the BBM preparation, evaluated from alkaline phosphatase activity, was 7-fold that of the homogenate.

#### *Immunodetection of P-gp*

P-gp was detected by Western blot analysis using mAbs C219, C494, JSB-1 or pAb Ab-1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the method of Laemmli [21] with slight modifications as described previously [16]. Electrophoretic transfer and immunodetection were also performed as described

previously [16]. MAbs C219 and C494 were used at a concentration of 200 ng/ml and JSB-1 was diluted 1/100 in Tris buffered saline (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) containing 0.3% Tween 20 (TBS-T) and 1% bovine serum albumin. The secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG, was diluted 1/2000 in TBS-T containing 2.5% milk powder for mAb C219 and 1/1000 in TBS-T containing 1% milk powder for mAb C494 and mAb JSB-1.

The same procedure was used with slight modifications for the immunodetection of P-gp with pAb Ab-1. Hydrophobic or non-specific sites were blocked with 3% milk powder in TBS, pH 8.0, containing 0.05% Tween 20 (TBS-T'). Membranes were washed twice in TBS-T' before incubation for 1h at 25°C with the primary antibody diluted 1/200 in TBS-T', 1% bovine serum albumin and 0.05% NaN<sub>3</sub>. The secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, was diluted 1/2000 in TBS-T' containing 1% milk powder.

After immunodetection, autoradiograms were scanned with a personal densitometer SI. The relative area under each peak was calculated.

---

## Results

The most widely used antibody to detect P-gp is C219, a mAb directed against cytoplasmic epitopes which are conserved among P-gp classes and species (amino acids 568-574 and 1213-1219) [22]. Immunodetection of P-gp by mAb C219 in crude membrane fractions from human tissues (fig. 1A) reveals the presence of P-gp as a protein of about 155 kDa, in brain capillaries, BBM, heart, kidney, skeletal muscle, liver, lung, brain and intestine, in decreasing order of abundance. It was absent from spleen, testis and pancreas. A slight difference in the molecular weight of P-gp was observed among the various tissues studied. These differences could be related to glycosylation of the protein since different levels of P-gp glycosylation was previously shown to affect its migration in polyacrylamide gels [23]. A protein of about 190-200 kDa was also detected by mAb C219 in testis, heart, lung, skeletal muscle and brain capillaries. This is a cross-reactive protein which has different biochemical characteristics than P-gp [16]. A strong cross-reactive protein of about 200 kDa, probably myosin, was especially abundant in heart and muscle. MAb C219 also revealed lower molecular-weight protein bands of weak intensity in liver, kidney, testis, heart, skeletal muscle, brain, BBM and brain capillaries.

The distribution of P-gp in human tissues has been studied with pAb Ab-1 which is directed against the C-terminal cytoplasmic domain (amino acids 1203-1224) of human and mouse P-gp (fig. 1B). P-gp was detected in liver, kidney and brain capillaries and, at very low levels, in heart and brain. However, several non-specific protein bands were also detected in these tissues. This antibody provides a weaker signal and labels more cross-reactive proteins than mAb C219.

Western blot analysis was also performed with mAb C494 (fig. 1C), an antibody directed against a cytoplasmic C-terminal epitope of the P-gp class I isoform of human and hamster [22]. No P-gp was detected in human tissues with this mAb, but non-specific proteins of different molecular weights were labeled from intestine, liver, kidney, testis, heart, skeletal muscle, brain, BBM and brain capillaries.

Another antibody which is used to study the expression of P-gp in human tissues, JSB-1 (fig. 1D), is directed against a cytoplasmic segment of the P-gp class I isoform of human and hamster [24]. However, with this antibody, P-gp was detected only in the kidney whereas non-specific protein bands were revealed in most tissues.

In hamster tissues, mAb C219 showed that P-gp was predominantly expressed in intestine, spleen and lung (fig. 2A). There were lower levels of P-gp in liver, kidney and testis, and still lower levels in thymus, skeletal muscle, brain and stomach. No P-gp was detected in pancreas. A protein of about 200 kDa which cross-reacts with mAb C219, probably myosin, was strongly expressed in heart. The antibody also cross-reacted with lower molecular weight proteins. MAb C494 was unable to detect P-gp in crude membrane fractions of hamsters tissues (fig. 2B) but reacted with other proteins of smaller molecular weight. P-gp over-expressed in CH<sup>R</sup>C5 cells was abundantly detected (fig. 2B). Controls made with the anti-mouse IgG coupled to peroxydase indicated that the non-specific labeling was due to the secondary antibody (fig. 2C).

MAb C219 detected P-gp in membrane fractions of all rat tissues except pancreas (fig. 3A). P-gp was strongly expressed in liver, kidney, heart, lung and very strongly in brain capillaries. Lower levels were detected in intestine, spleen, brain and stomach and very low levels in testis, thymus and skeletal muscle. Cross-reactive proteins of about 200 kDa, detected by mAb C219, were labeled at high levels in brain capillaries and in heart, where myosin is present and at lower levels in thymus and lung. With pAb Ab-1, P-gp was found at a very high level in brain capillaries, at high levels in liver and kidney, at a lower level in lung and at very low levels in intestine, spleen, testis, heart and brain (fig. 3B). Cross-reactive proteins were found in liver, kidney, testis, lung, skeletal muscle, brain and brain capillaries.

Western blots of rabbit tissues, labeled with mAb C219 showed high levels of P-gp in intestine, liver, spleen, testis, heart and lung, a low level in pancreas and very low levels in skeletal muscle, brain and stomach (fig. 4). The cross-reactive protein of about 200

kDa strongly expressed in heart and pancreas and more weakly expressed in lung and stomach.

In mouse tissues, mAb C219 detected high levels of P-gp in intestine, liver, spleen, kidney, heart, lung and brain capillaries, lower levels in testis and skeletal muscle and very weak levels in thymus, brain and stomach (fig. 5A). No P-gp was detected in pancreas. Cross reactive proteins of about 190-200 kDa were present in kidney, heart, lung and brain capillaries. Many non-specific protein bands, with smaller molecular weights, were also revealed. In addition, when the blots were incubated with the secondary antibody only, many bands were also detected (fig. 5B).

The levels of P-gp detected with mAb C219 were quantified and expressed relative to those from liver for the tissues of each species (Table 1) since, in this tissue, the levels of P-gp detected were most constant among the different species. The amount of P-gp detected was highly variable from tissue to tissue and also from species to species. In human and rat tissues, the highest levels of P-gp were detected in the kidney whereas in hamster, rabbit and mouse, the highest levels were found in lung and intestine. In the spleen, testis, heart, and skeletal muscle, P-gp levels were highly variable from species to species. P-gp was detected at very low levels in thymus and was absent from pancreas except in the rabbit where it was about as abundant as in liver. Brain and stomach membranes present low levels of P-gp in all species.

P-gp expression was analysed in various human tumors (fig. 6). The levels of P-gp expression were many times lower in tumors than in normal brain capillaries taken as a control. P-gp levels varied strongly between tumors. P-gp was detected in one of two lymphomas, one of five rhabdomyosarcomas, one of two osteosarcomas, an hepatosarcoma, a medulloblastoma and a neuroblastoma. It was not detected in two Hodgkin's lymphomas, a sarcoma and a Burkitt's lymphoma. Cross-reactive proteins were detected in tumors studied. These cross-reactive proteins could be the cause of false

positive results in clinical diagnoses using other immunochemical methods which do not discriminate between P-gp and these proteins.

---

## Discussion

The expression of P-gp in different tissues and species was studied using different antibody preparations. Western blot analysis was used to reduce the possibility of false positives by discriminating between P-gp and proteins that cross-react with the antibodies.

MAb C219, which recognizes all P-gp isoforms, detected P-gp in almost all tissues studied from human, hamster, rat and mouse except pancreas. The highest levels of P-gp were found in brain capillaries. This suggests an important physiological role at blood-brain barrier site. In mouse brain capillaries, where class I is the major isoform expressed [25], P-gp was proposed to contribute to the barrier by expelling drugs such as ivermectin and vinblastine from the brain into the blood [9]. It was also suggested that P-gp could function as a drug efflux pump at the luminal side and regulate transfer of lipophilic molecules from the blood into the brain [26]. The high level of P-gp detected in brain capillaries, probably maintained in part by a tissue-specific factor in the brain matrix [27], reflects the importance for this tissue to protect itself against external agents or to expulse lipophilic agents from the brain.

MAb C494 which recognizes the class I isoform detected P-gp only in membranes from CH<sup>R</sup>C5 cells where P-gp is highly overexpressed. The third mAb used, JSB-1, detected P-gp only in membranes from CH<sup>R</sup>C5 cells and in the human kidney. MAb C219 is thus more sensitive than these two mAbs for P-gp detection by Western blot analysis. Since mAb C494 and mAb JSB-1 were not sensitive enough, or not appropriate for Western blot analysis, the determination of the isoform of P-gp expressed in the different tissues studied was not possible. In flow cytometry, mAb JSB-1 seemed more sensitive than the mAb C219 [28]. The difference in sensitivity may be related to the fact that permeabilization of the plasma membrane is required for flow cytometric detection of P-gp since both antibodies react with intracellular domains at the C-terminal region close to the ATP binding sites of P-gp [28].



P-gp distribution studies have been previously performed by immunohistochemistry using human tissues. High levels of P-gp were detected with mAbs C219, JSB-1 and MRK-16 in liver and intestine, low levels in stomach and spleen, and very low levels in lung, brain and kidney and no P-gp was detected in testis [29]. Discordant results were obtained with these antibodies in heart, pancreas and skeletal muscle, since levels of detection of P-gp varied from an antibody to another [29]. Similar results were obtained by Pavelic et al. [30] except in spleen where P-gp detection was negative and in brain where it was strong. These variations in the detection of P-gp between various studies using different antibodies might be related to cross-reactivity of the three mAbs with proteins other than P-gp. Our results reinforce this hypothesis since we detected non-specific bands from the different species, especially hamster and mouse. Several of these bands from mouse and hamster are caused by the reactivity of the second antibody which is directed against mouse IgG. The different results obtained from different studies show clearly the necessity to develop an appropriate consensus method for analysis of P-gp expression.

In tumors, P-gp expression is much lower than in brain capillaries. P-gp expression was also found to be lower in colorectal carcinomas than in normal colorectal mucosa [31]. A wide variation in P-gp expression between tumors was found in agreement with previous studies. P-gp expression was reported to be strong in brain tumors [32], neuroblastomas [33, 34], osteosarcomas [35] and lymphomas [33, 36], correlating partially with our results. Expression is also usually strong in tumors derived from liver [33, 37, 38]. P-gp appears to be expressed in most cases of adrenocortical carcinomas [39] whereas it shows wide variation in colorectal carcinomas [31]. These reports, combined with our present results, demonstrate that P-gp expression varies widely among various types of tumors and also among tumors of the same type, and may explain the variability in the success of chemotherapy. Since chemotherapy can induce P-gp expression [33, 40, 41], it is important to quantify P-gp at various stages of the treatment.

P-gp expression in rhabdomyosarcoma, sarcoma, neuroblastoma [42-44] and osteosarcoma [41] was reported to correlate with outcome of chemotherapy. This stresses the importance to quantify P-gp for prognosis. Interestingly, the relative amount of P-gp, on a protein basis, was strikingly higher in normal brain capillaries than in any of the tumor tissues we examined. This is important, in relation to potential neurological side effects caused by inhibition of P-gp of the blood brain barrier, by chemosensitizing agents. In agreement with this, the main side effect of a promising chemosensitizer, PSC 833, a non-immunosuppressive analog of cyclosporin, was indeed neurological, i.e. ataxia [45].

In conclusion, P-gp is expressed at various levels in many tissues from different species. Special attention should be taken for its immunodetection because of pitfalls caused by cross-reactivity of antibodies with proteins other than P-gp, thus producing false positive results.

---

**Acknowledgements**

We thank Marie-France Bélanger and Julie Poirier for their technical support and Dr Vincent Vachon for his critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and from Sandoz Canada Inc. Edith Beaulieu received a scholarship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

---

## References

1. Pastan, I. and Gottesman, M.M. 1987. *N. Engl. J. Med.* 316, 1388-1393.
2. Endicott, J.A. and Ling, V. 1989. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137-171.
3. Kartner, N. and Ling, V. 1989. *Sci. Am.* March, 44-52.
4. Georges, E., Sharom, F.J. and Ling, V. 1990b. *Adv. Pharmacol.* 21, 185-215.
5. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. and Willingham, M.C. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7735-7738.
6. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. and Bertino, J.R. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 695-698.
7. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. and Willingham, M.C. 1989. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 159-164.
8. Jetté, L., Têtu, B. and Béliveau, R. 1993. *Biochim. Biophys. Acta* 1150, 147-154.
9. Schinkel, A.H., Smit, J.J.M., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P.J., Berns, A.J.M. and Borst, P. 1994. *Cell* 77, 491-502.
10. Gottesman, M.M., Schoenlein, P.V., Currier, S.J., Bruggeman, E.P. and Pastan, I. 1991. *Biochemical and molecular aspects of selected cancer* 1, 339-371.
11. Smit, J.J.M., Schinkel, A.H., Oude-Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhof, R., Van der Lugt, N.M., Van Roon, M.,

- Van der Valk, M.A., Offerhaus, G.J., Berns, A.J. and Borst, P. 1993. *Cell* 75, 451-462.
12. Smit, J.J.M., Schinkel, A.H., Mol, C.A., Majoor, D., Mooi, W.J., Jongsma, A.P.M., Lincke, C.R. and Borst, P. 1994. *Lab. Invest.* 71, 638-649.
  13. Ruetz, S. and Gros, P. 1994. *Cell* 77, 1071-1081.
  14. Kawai, K., Kusano, I., Ido, M., Sakurai, M., Shiraishi, T. and Yatani, R. 1994. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 804-810.
  15. Thévenod, F., Anderie, I. and Schulz, I. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 24410-24417.
  16. Beaulieu, E., Demeule, M., Pouliot, J.-F., Averill-Bates, D.A., Murphy, G.F. and Béliveau, R. 1995. *Biochim. Biophys. Acta* 1233, 27-32.
  17. Rao, V.V., Anthony, D.C. and Piwnica-Worms, D. 1994. *Cancer Res.* 54, 1536-1541.
  18. Rao, V.V., Anthony, D.C. and Piwnica-Worms, D. 1995. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 1187-1192.
  19. Dallaire, L., Tremblay, L. and Béliveau, R. 1991. *Biochem. J.* 276, 745-752.
  20. Booth, , A.G. and Kenny, A.J. 1974. *Biochem. J.* 142, 575-581.
  21. Laemmli, U.K. 1970. *Nature* 227, 680-685.
  22. Georges, E., Bradley, G., Gariepy, J. and Ling, V. 1990a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 152-156.
  23. Ichikawa, M., Yoshimura, A., Furukawa, T., Sumizawa, T., Nakazima, Y. and Akiyama, S.-I. 1991. *Biochim. Biophys. Acta* 1073, 309-315.

24. Scheper, R.J., Bulte, J.W.M., Brakkee, J.G.P., Quak, J.J., Van der Schoot, E., Balm, A.J.M., Meijer, C.J.L.M., Broxterman, H.J., Kuiper, C.M., Lankelma, J. and Pinedo, H.M. 1988. *Int. J. Cancer* 42, 389-394.
25. Jetté, L., Pouliot, J.-F., Murphy, G.F. and Béliveau, R. 1995. *Biochem. J.* 305, 761-766.
26. Tsuji, A., Terasaki, T., Takabatake, Y., Tenda, Y., Tamai, I., Yamashima, T., Moritani, S., Tsuruo, T. and Yamashite, J. 1992. *Life Sci.* 51, 1427-1437.
27. Tatsuta, T., Naito, M., Mikami, K. and Tsuruo, T. 1994. *Cell Growth Diff.* 5, 1145-1152.
28. Lehne, G., De Angelis, P., Clausen, O.P.F., Egeland, T., Tsuruo, T. and Rugstad, H.E. 1995. *Cytometry* 20, 228-237.
29. Van der Valk, P., van Kalken, C.K., Ketelaars, H., Broxterman, H.J., Scheffer, G., Kuiper, C.M., Tsuruo, T., Lankelma, J., Meijer, C.J.L.M., Pinedo, H.M. and Scheper R.J. 1990. *Ann. Oncol.* 1, 56-64.
30. Pavelic, Z.P., Reising, J., Pavelic, L., Kelley, D.J., Stambrook, P.J. and Gluckman, J.L. 1993. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 119, 753-757.
31. De Angelis, P., Stokke, T., Smedshammer, L., Lothe, R.A., Lehne, G., Chen, Y. and Clausen, O.P.F. 1995. *Br. J. Cancer* 72, 307-311.
32. Mousseau, M., Chauvin, C., Nissou, M.F., Chaffanet, M., Plantaz, D., Pasquier, B., Schaerer, R. and Benabid, A. 1993. *Eur. J. Cancer* 29A, 753-759.
33. Pastan, I. and Gottesman, M.M. 1991. Multidrug resistance. *Annu. Rev. Med.* 42, 277-286.

34. Ramani, P. and Dewchand, H. 1995. *J. Pathol.* 175, 13-22.
35. Serra, M., Scotlandi, K., Manara, M.C., Maurici, D., Benini, S., Sarti, M., Campanacci, M. and Baldini, N. 1995. *Eur. J. Cancer* 31A, 1998-2002.
36. Kang, Y.-K., Zhan, Z., Regis, J., Robey, R., Meadows, B., Dickstein, B., Lee, J.S., Otsuki, T., Stetler-Stevenson, M., Jaffe, E.S., Solomon, D., Wilson, W.H., Fojo, A. and Bates, S.E. 1995. *Blood* 86, 1515-1524.
37. Teeter, L.D., Hsu, H.-C., Curley, S.A., Tong, M.J. and Kuo, M.T. 1992. *Int. J. Oncol.* 2, 73-80.
38. Fardel, O., Loyer, P., Lecureur, V., Glaise, D. and Guillouzo, A. 1994. *Eur. J. Biochem.* 219, 521-528.
39. Flynn, S.D., Murren, J.R., Kirby, W.M., Honig, J., Kan, L. and Kinder B.K. 1992. *Surgery* 112, 981-986.
40. Hijazi, Y.M., Axiotis, C.A., Navarro, S., Steinberg, S.M., Horowitz, M.E. and Tsokos, M. 1994. *Am. J. Clin. Pathol.* 102, 61-67.
41. Baldini, N., Scotlandi, K., Barbanti-Brodano, G., Manara, M.C., Maurici, D., Bacci, G., Bertoni, F., Picci, P., Sottili, S., Campanacci, M. and Serra, M. 1995. *N. Engl. J. Med.* 333, 1380-1385.
42. Chan, H.S., DeBoer, G., Thorner, P.S., Haddad, G., Gallie, B.L. and Ling, V. 1994. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 8, 383-410.
43. Chan, H.S.L., DeBoer, G., Haddad, G., Gallie, B.L. and Ling, V. 1995. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9, 275-318.

44. Chan, H.S., DeBoer, G., Haddad, G. and Ling, V. 1995. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9, 889-908.
  45. Boote, D.J., Dennis, I.F., Twentyman, P.R., Osborne, R.J., Laburte, C., Hensel, S., Smyth, J.F., Brampton, M.H. and Bleehen, N.M. 1996. *J. Clin. Oncol.* 14, 610-618.
-



## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Detection of P-gp from human tissues.

Proteins from crude membrane fractions of human tissues (30  $\mu\text{g}$ ) or from human brain capillaries (15  $\mu\text{g}$ ) were loaded onto 1.5-mm thick polyacrylamide gels. Immunodetection was performed as described in the Materials and Methods section with mAb C219 (A), pAb Ab-1 (B), mAb C494 (C) and mAb JSB-1 (D).

Fig. 2. Detection of P-gp from hamster tissues.

Proteins from crude membrane fractions of hamster tissues (30  $\mu\text{g}$ ) or from CH<sup>R</sup>C5 cells (15  $\mu\text{g}$ ) were loaded onto 1.5-mm thick polyacrylamide gels. Immunodetection was performed as described in the Materials and Methods section with mAb C219 (A), mAb C494 (B) and with the secondary antibody coupled to peroxylase only (C).

Fig. 3. Detection of P-gp from rat tissues.

Proteins from crude membrane fractions of rat tissues (30  $\mu\text{g}$ ) or from rat brain capillaries (15  $\mu\text{g}$ ) were loaded onto 1.5-mm thick polyacrylamide gels. Immunodetection was performed as described in the Materials and Methods section with mAb C219 (A) and pAb Ab-1 (B).

Fig. 4. Detection of P-gp from rabbit tissues using mAb C219.

Proteins (30  $\mu\text{g}$ ) from crude membrane fractions of rabbit tissues were loaded onto 1.5-mm thick polyacrylamide gels. Immunodetection was performed as described in the Materials and Methods section.

Fig. 5. Detection of P-gp from mouse tissues.

Proteins from crude membrane fractions of mouse tissues (30  $\mu\text{g}$ ) or from mouse brain capillaries (15  $\mu\text{g}$ ) were loaded onto 1.5-mm thick polyacrylamide gels. Immunodetection

was performed as described in the Materials and Methods section with mAb C219 (A) and with the secondary antibody coupled to peroxydase (B).

Fig. 6. Detection of P-gp from human tumors using mAb C219.

Proteins from crude membrane fractions of various tumors (30  $\mu\text{g}$ ) including 1 neuroblastoma (Neuro.), 5 rhabdomyosarcomas (Rhabd.), 1 Burkitt's lymphoma (Burk.), 2 lymphomas (Lymph.), 2 Hodgkin's lymphomas (Hodg.), 1 hepatosarcoma (Hepato.), 2 osteosarcomas (Osteo.), 1 sarcoma (Sarc.) and 1 medulloblastoma (Med.) or from brain capillaries (15  $\mu\text{g}$ ) (CAP) were loaded onto 1.5-mm thick polyacrylamide gels. Immunodetection was performed as described in the Materials and Methods section.

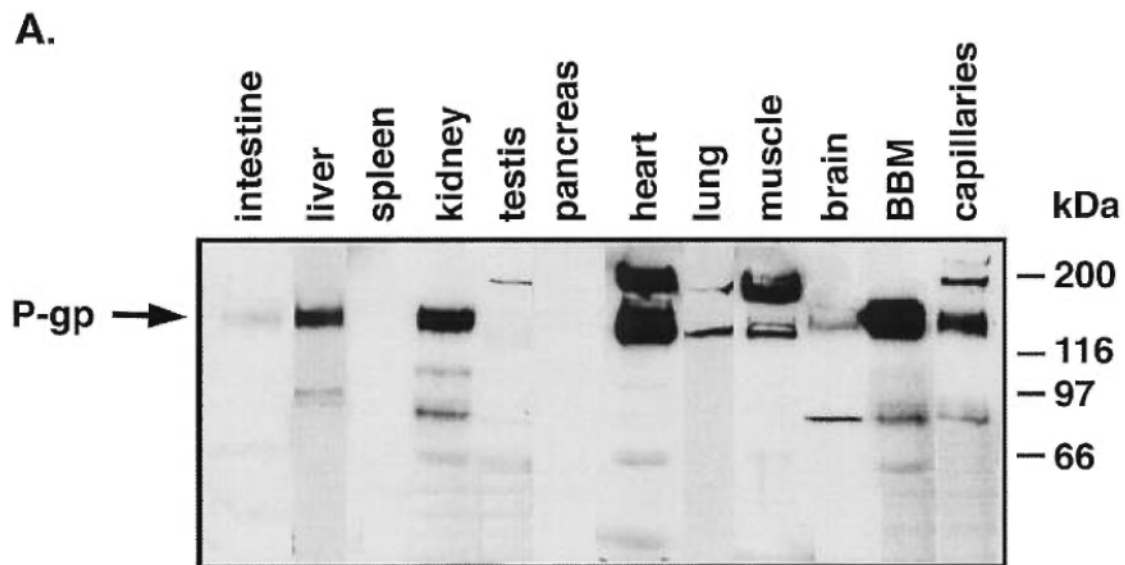
---

Table 1

Detection of P-gp from different tissues of various species with C219.

Tissue	Species				
	Human	Hamster	Rat	Rabbit	Mouse
Intestine	N.M.	2.8	0.2	5.2	1.4
Liver	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Spleen	N.D.	2.6	0.2	1.5	0.4
Kidney	1.8	0.8	2.9	N.D.	1.0
Testis	N.M.	0.3	0.1	2.4	0.2
Pancreas	N.D.	N.D.	N.D.	0.8	N.D.
Heart	2.3	0.4	0.5	1.5	0.6
Thymus	N.A.	0.04	0.05	N.A.	N.D.
Lung	0.5	2.8	1.6	4.3	1.1
Skeletal muscle	0.8	0.2	0.05	N.D.	0.2
Brain	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1
Stomach	N.A.	0.2	0.1	0.2	0.1

Autoradiograms of Western blots performed in duplicate with crude membrane fractions from two specimens or more were scanned with a personal densitometer SI. The relative area under each peak was calculated and expressed relative to that obtained for liver. N.D., not detected by immunodetection; N.A., not available; N.M., not measurable by the densitometer because the signal was too low.



**Figure 1A.** Detection of P-gp from human tissues by mAb C219.

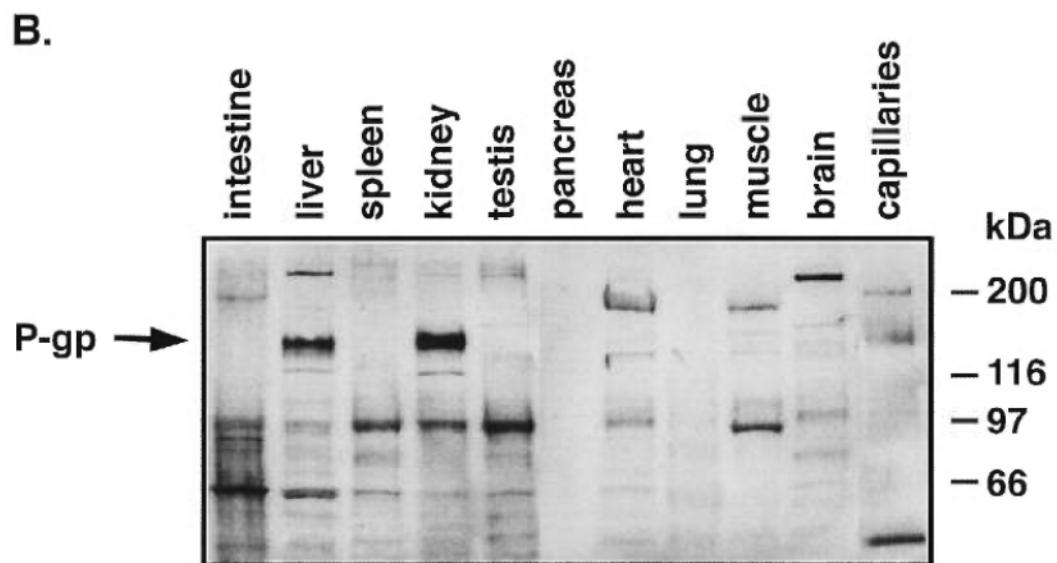


Figure 1B. Detection of P-gp from human tissues by pAb Ab-1.

C.

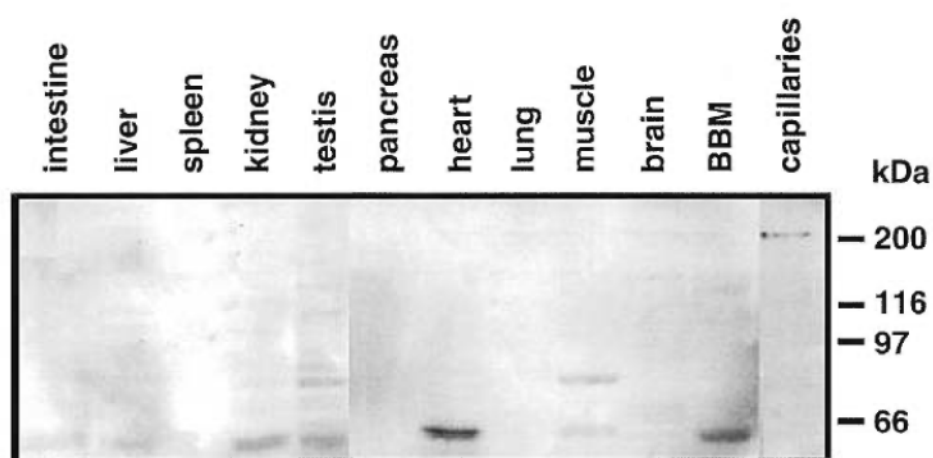


Figure 1C. Detection of P-gp from human tissues by mAb C494.

D.

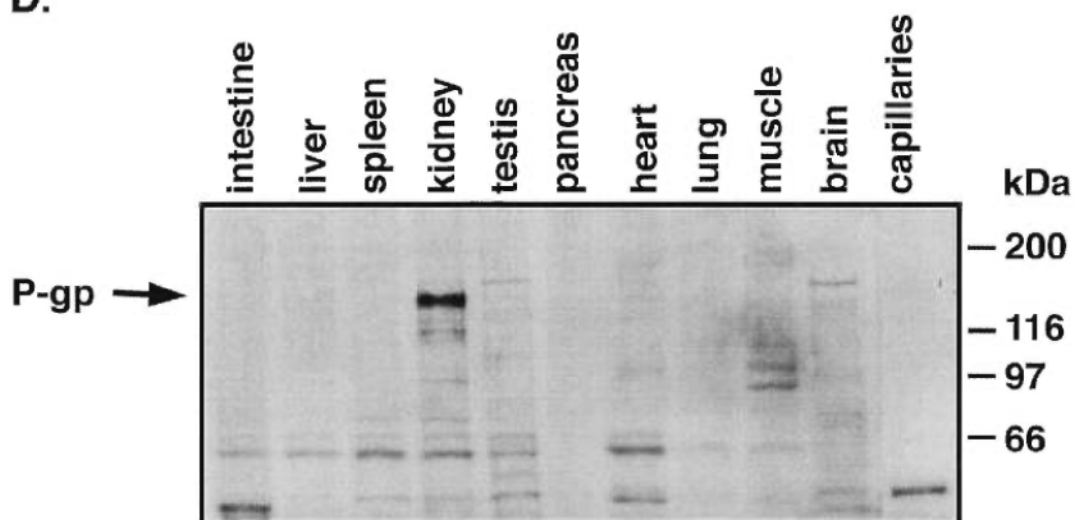


Figure 1D. Detection of P-gp from human tissues by mAb JSB-1.

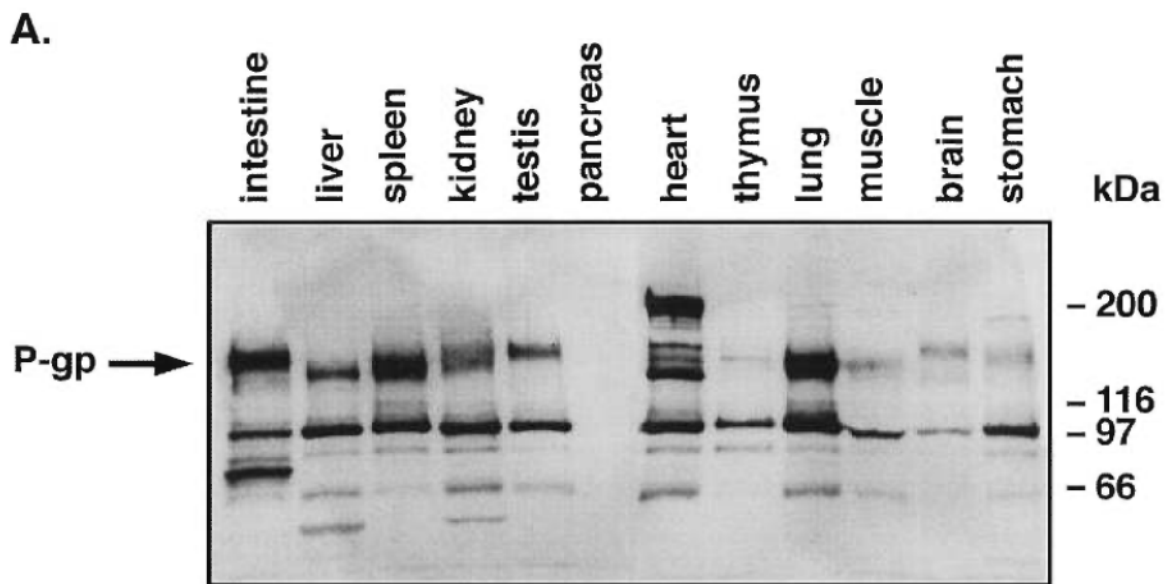


Figure 2A Detection of P-gp from hamster tissues by mAb C219.



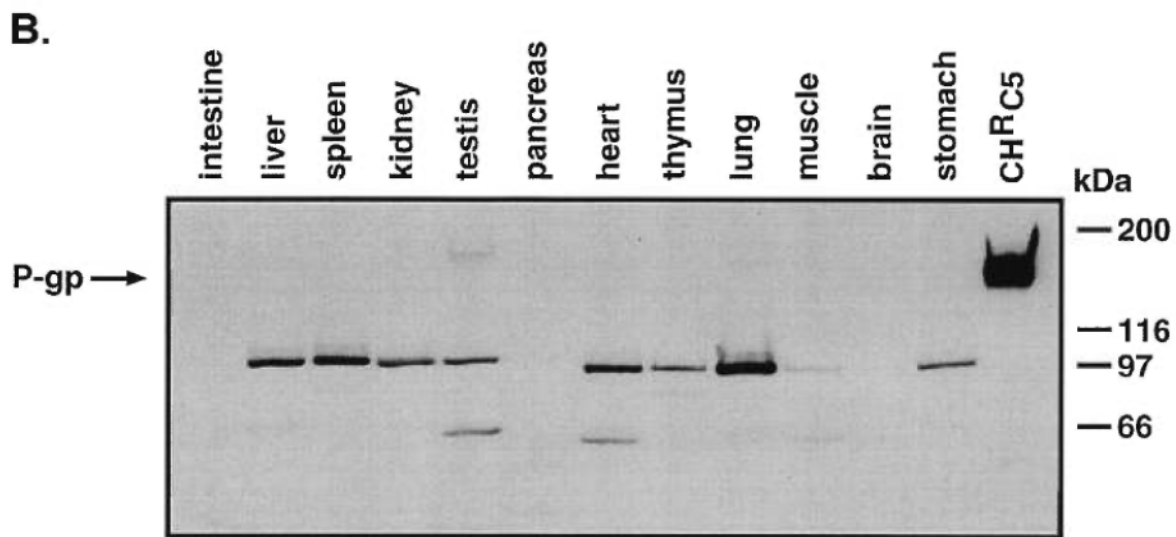


Figure 2B Detection of P-gp from hamster tissues by mAb C494.

C.

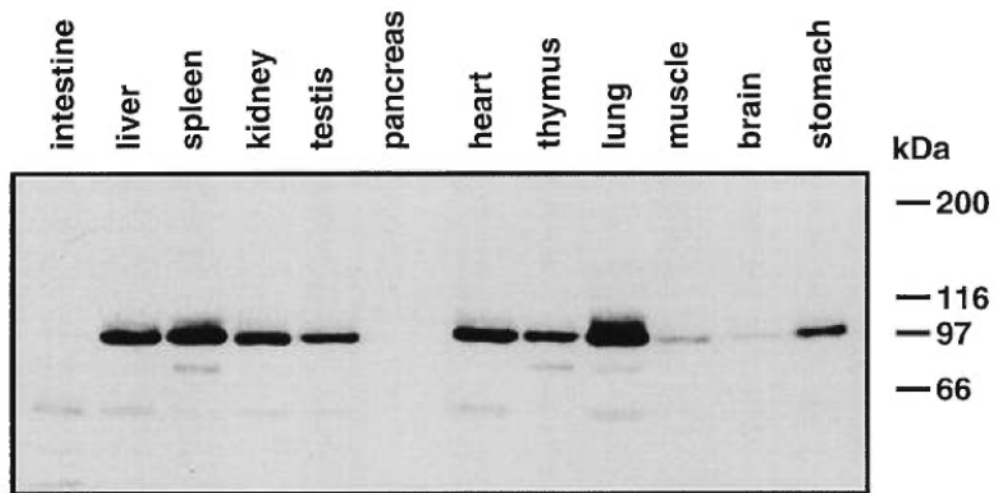
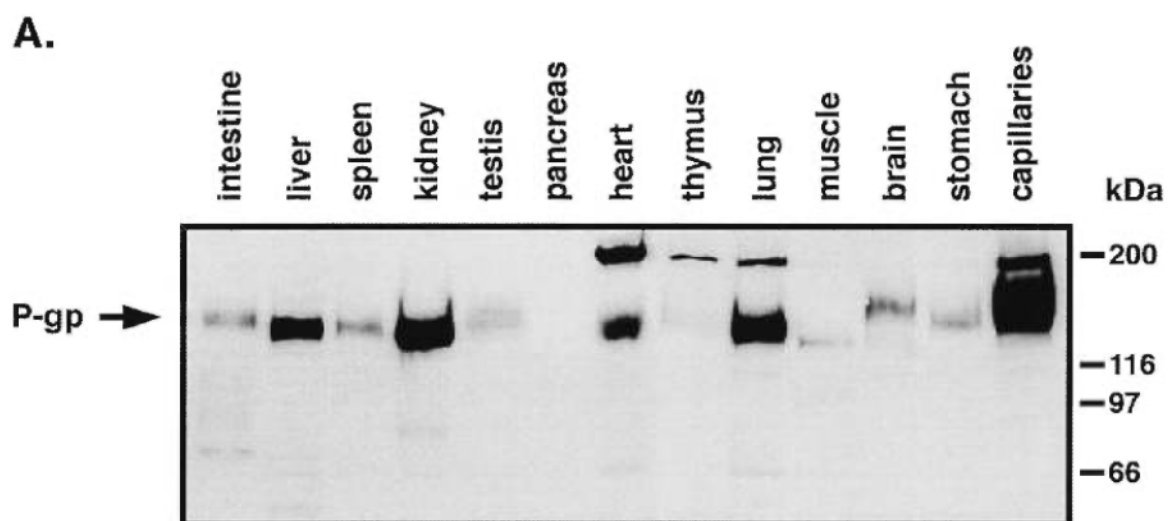


Figure 2C Control of secondary antibody in detection of P-gp from hamster tissues.



**Figure 3A.** Detection of P-gp from rat tissues by mAb C219.

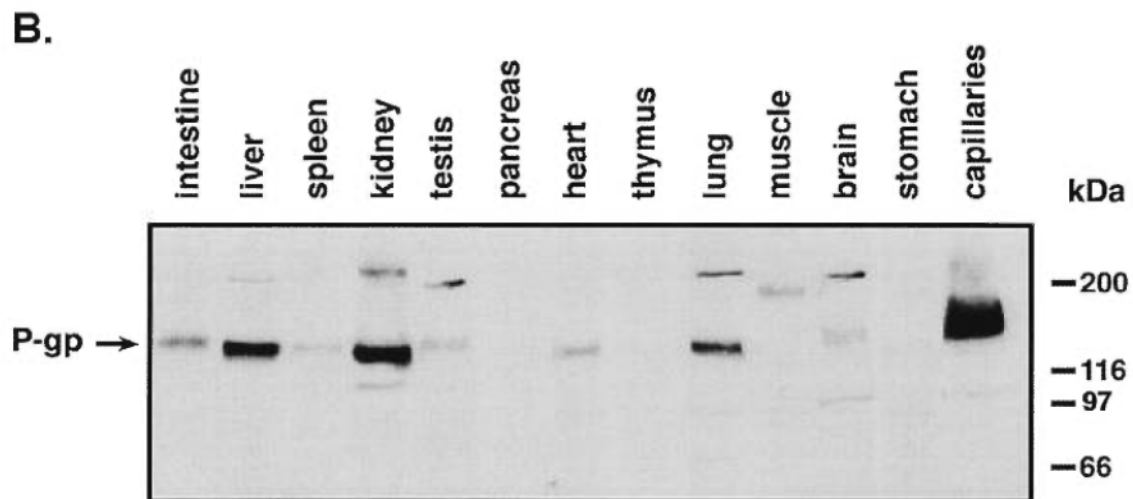
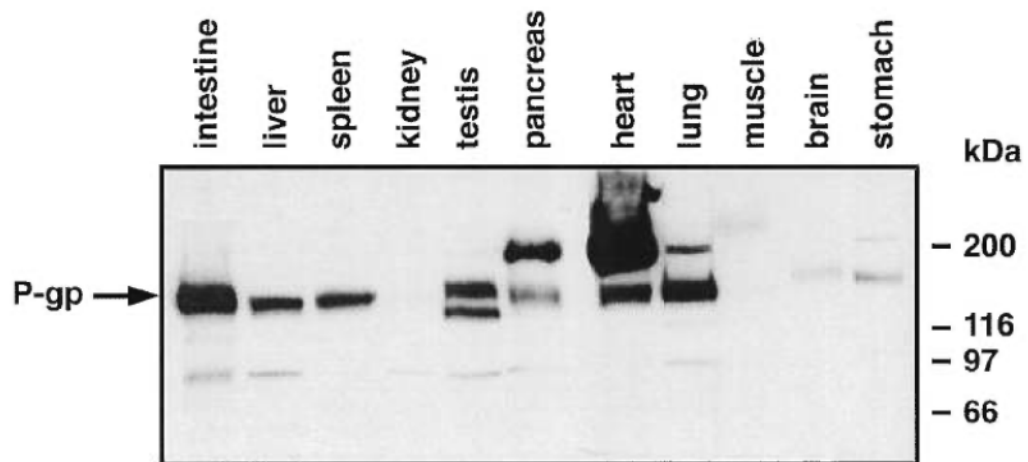
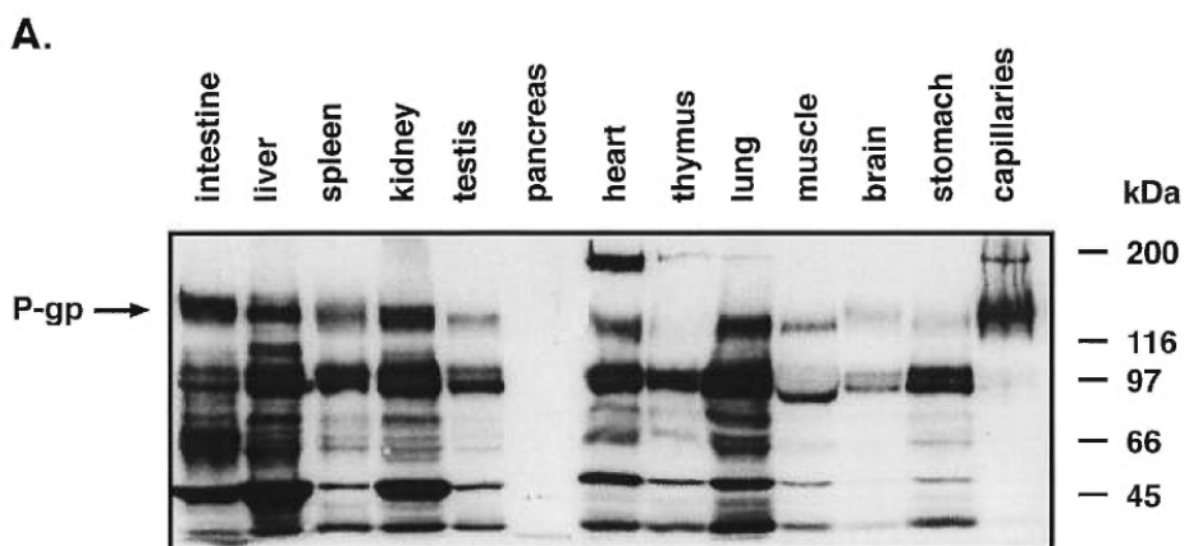


Figure 3B. Detection of P-gp from rat tissues by pAb Ab-1.



**Figure 4. Detection of P-gp from rabbit tissues using mAb C219.**



**Figure 5A.** Detection of P-gp from mouse tissues.

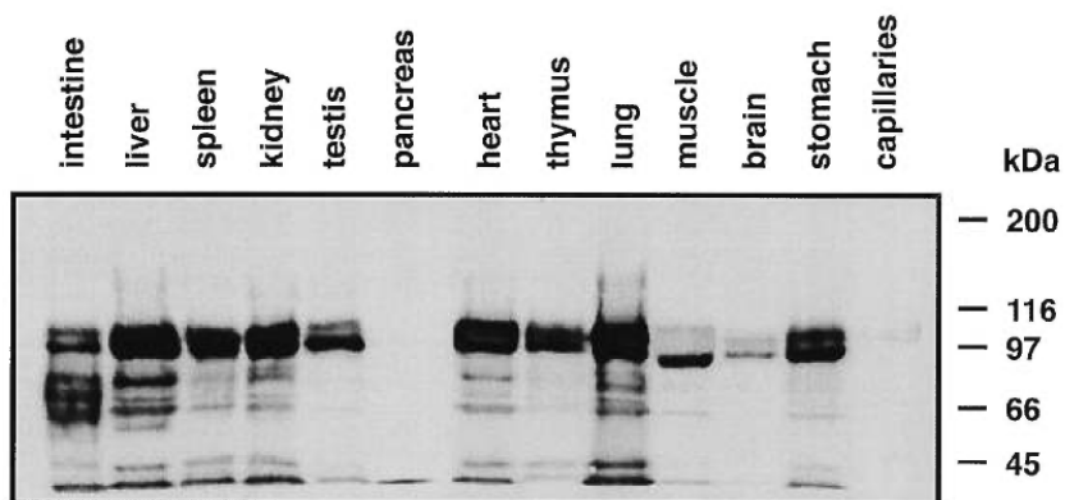
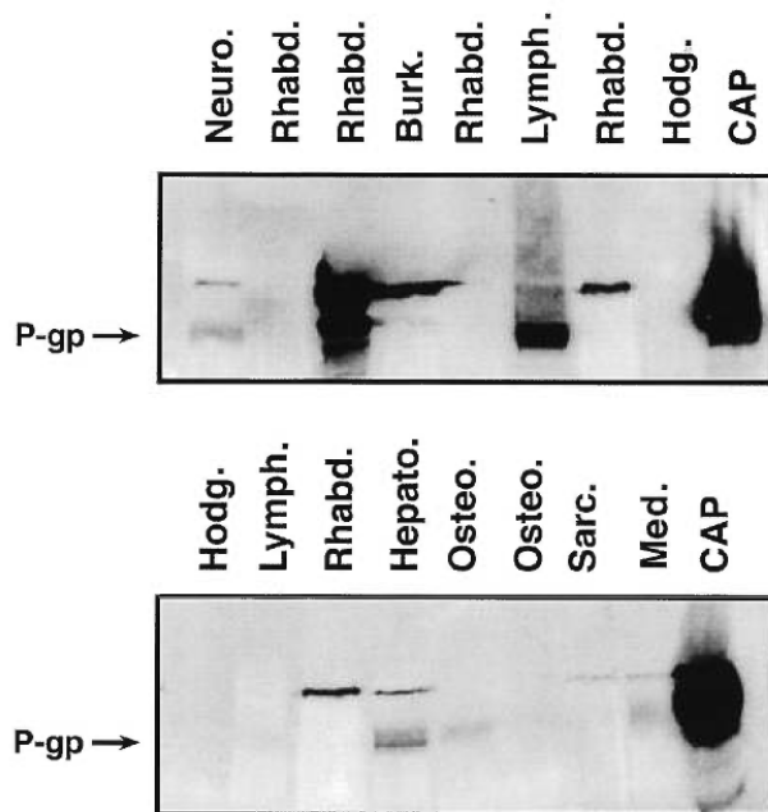
**B.**

Figure 5B. Control of secondary antibody in detection of P-gp from mouse tissues.



**Figure 6.** Detection of P-gp from human tumors using mAb C219.



**P-GLYCOPROTEIN IS STRONGLY EXPRESSED IN THE LUMINAL MEMBRANES OF THE ENDOTHELIUM OF BLOOD VESSELS IN THE BRAIN**

Édith Beaulieu<sup>§</sup>, Michel Demeule<sup>§</sup>, Lucian Ghitescu<sup>‡</sup> and Richard Béliveau <sup>§†¶</sup>

*§Laboratoire d'oncologie moléculaire, Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8 and †Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada, H1W 2C4, ‡Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7*

---

Abbreviations: HB: homogenate buffer, DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium, GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein, IAAP: [<sup>125</sup>I]iodoarylazidoprazosin, mAb: monoclonal antibody, pAb: polyclonal antibody, MBS: MES-buffered saline, TBS: Tris-buffered saline, TBS-Tw: TBS-Tween 20.

---

¶ To whom correspondence should be addressed at the Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. Phone: (514) 987-3000 ext 8551; Fax: (514) 987-4054.

## SUMMARY

Luminal membranes of the vascular endothelium were isolated from brain, heart and lungs by modification of their density. The presence of P-glycoprotein (P-gp) was detected by Western blotting in luminal membranes from the endothelium of the three tissues. Strong enrichment in brain capillary luminal membranes, compared with brain capillaries (17-fold) and whole membranes (400-500 fold), indicates that P-gp is mainly located on the luminal side of the brain endothelium. Western blotting was also performed with antibodies directed against GLUT-1, Glial Fibrillary Acidic Protein, adaptin, IP<sub>3</sub>R-3, integrins  $\alpha$ v and collagene IV as controls to determine whether these preparations were contaminated by other membranes. Strong enrichment for GLUT-1 in brain capillary luminal membranes (9.9-fold) showed that the preparation was mainly constituted of endothelial cell plasma membranes. Poor enrichment for Glial Fibrillary Acidic Protein (1.4-fold) and adaptin (2.4-fold) and a decreased level of IP<sub>3</sub>R-3, integrins  $\alpha$ v and collagene IV exclude the possibility of a major contamination by astrocytes or internal and antiluminal membranes. High levels of P-gp in the luminal membranes of brain capillary endothelial cells suggests it could play an important role in limiting the access of anticancer drugs to the brain.

---

## INTRODUCTION

The multidrug resistance phenotype, characterized by the overexpression of P-glycoprotein (P-gp), is a major problem encountered during chemotherapy [1,2]. P-gp, a member of the ABC transporter superfamily, is a glycosylated 140-170-kDa protein with twelve transmembrane domains and two cytoplasmically-located ATP binding sites. It was shown to actively transport a wide variety of agents including Vinca alkaloids, colchicine, antibiotics and anthracyclines out of cells by an ATP-dependent mechanism, thus reducing their cytosolic concentration [3-5]. P-gp is expressed in some chemotherapy-resistant tumors [6] and in many normal tissues [7,8] where its physiological function still remains unclear in spite of suggested roles in detoxification by excluding toxins from normal cells, secretion of metabolites into bile, urine and the gastrointestinal tract [7,8,10]. Very high levels of P-gp were found particularly in brain capillaries [8,11] where it interacts with various drugs [12] and appears to play a critical role in host defense against certain lipophilic toxins [13].

Immunohistological studies have suggested that P-gp is localized in the luminal membrane of endothelial cells forming brain blood vessels [14,15]. P-gp could thus contribute to multidrug resistance in brain tumors by expelling drugs from the endothelial cells into the circulation in addition to extruding them from tumoral cells [16]. P-gp could contribute greatly to the properties of the blood-brain barrier where blood vessels are not fenestrated in contrast with other tissues such as the heart and lungs. Determination of its cellular localization in blood vessels is important to understand its physiological function. It could also contribute to clarify why combinations of chemotherapeutic agents and P-gp blockers lead to a greater toxicity than it was anticipated and eventually overcome this barrier.

In this study, luminal membranes from brain, heart and lungs were isolated with a method previously applied to lung blood vessels [17]. In this method, the density of the

endothelial luminal membrane is modified with cationic colloidal silica overcoated with a polyanion cross-linker, thus allowing its isolation by centrifugation (Fig. 1). Immunoblotting analysis of P-gp, using the monoclonal antibody (mAb) C219 and the polyclonal antibody (pAb) anti-mdr Ab-1, showed the presence of P-gp in the luminal membranes of the endothelial cells forming blood vessels in all three tissues studied, but it was most strongly enriched in the brain capillaries.

---

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Dextran T-70 and fast flow Protein A sepharose were purchased from Pharmacia LKB Biotechnology (Montreal, Que.). Electrophoresis reagents and Tween 20 were products of Bio-Rad (Mississauga, Ont.). MAb C219 was from ID Labs (London, Ont.), mAbs anti-GFAP and anti- $\alpha$ -Adaptin, from Sigma (St-Louis, MO), mAb anti-IP<sub>3</sub>R-3, from Transduction Laboratories (Mississauga, Ont.), mAb anti-integrin  $\alpha$ v from Chemicon International (Temecula, CA), mAb anti-collagen IV (M3F7), from the Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, IA) and pAb anti-GLUT-1, from Eastacres Biologicals (Southbridge, MA). Horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG, donkey anti-rabbit IgG and enhanced chemiluminescence reagents were obtained from Amersham (Oakville, Ont.). Endoglycosidase F/N-glycosidase F and Hepes were from Boehringer-Mannheim (Laval, Que), SDS was from Pierce (Rockford, IL) and [<sup>125</sup>I]iodoarylazidoprazosin (IAAP) was from Du Pont (Mississauga, Ont). All other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

**Rats.** Male Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River (St-Constant, Que.).

**Luminal membranes.** Luminal membranes from the endothelium of whole brain, heart and lungs were prepared according to Jacobson et al. [17] as illustrated in Fig. 1. Briefly, brain, heart or lung microvasculature were coated with colloidal silica and polyacrylate by perfusion with: 1. DMEM/nitroprusside (25-30°C) to remove blood from the vasculature and to reduce the temperature, 2. MES buffered saline, pH 6.0 (MBS) to optimize the pH for coating, 3. colloidal silica, 4. MBS to eliminate unbound silica, and 5. 1% sodium polyacrylate in MBS. Organs were then homogenized in Hepes-buffered sucrose, filtered through a nylon monofilament net, diluted with an equal volume of 1.02 g/ml Nycodenz and centrifuged to isolate silica-coated plasmalemmal fragments and eliminate contaminating debris.

**Whole membranes.** Tissues were homogenized in 8 volumes of 250 mM sucrose and 5 mM Hepes/Tris, pH 7.5. Homogenates were centrifuged at 3 000 X g for 10 min at 4°C and the supernatants were centrifuged at 33 000 X g for 30 min at 4°C. Pellets were resuspended in homogenate buffer (HB) containing 50 mM mannitol and 20 mM Hepes/Tris, pH 7.5, and stored at -80°C.

**Brain capillaries.** Capillaries were purified from brain cortex with the method of Dallaire et al [18] with slight modifications as described previously [19].  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase activity was enriched at least 15-fold.

**Western blot analysis.** Proteins were solubilized in 0.5% SDS in HB for 30 min at 25°C, centrifuged at 50 000 X g for 15 min, and supernatant proteins were measured using a micro BCA (Bicinchoninic acid) kit (Pierce, Rockford, IL). SDS-PAGE and immunodetection of P-gp with mAb C219 were performed as described previously [19]. Immunodetection of P-gp with pAb anti-mdr Ab-1 was performed with slight modifications. All steps were carried out in Tris-buffered saline-0.05% Tween, pH 8.0 (TBS-Tw (0.05%)). The primary antibody was diluted 1/200 and the secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (from donkey), was diluted 1/2000 in 1% powdered skimmed milk in TBS-Tw. Immunodetection of GLUT-1 was performed as described by Pouliot and Béliveau [20]. Immunodetection of all other proteins was carried out in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-Tw (0.1%)). The primary antibodies were diluted 1/500 in TBS-Tw (0.1%) containing 1% BSA and 0.02% NaN<sub>3</sub> and the secondary antibodies (sheep anti-mouse IgG or donkey anti-rabbit IgG) were diluted 1/1000 in 5% milk in TBS-Tw (0.1%). For the immunodetection of IP<sub>3</sub>R-3 and integrin  $\alpha_v$ , samples were heated at 100°C for 5 minutes prior to electrophoresis. Molecular weights were determined with a calibration curve made with Bio-Rad standards: myosin (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), phosphorylase *b* (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa) and ovalbumin (45 kDa).

**Deglycosylation.** Capillaries were resuspended in HM at a protein concentration of 6 mg/ml, and were solubilized 10 min at 25°C in 0.5% SDS. The samples were diluted in HM containing 0.25%  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 2 U/mg protein of endoglycosidase F/N-glycosidase F and protease inhibitors (2  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A and 100  $\mu$ g/ml bacitracin). Deglycosylation was carried out overnight at 25°C. Laemmli's sample buffer was added and Western blot analysis was performed as described above.

**Photoaffinity labelling.** Photoaffinity labelling with [ $^{125}$ I]iodoarylazidoprazosin (IAAP) was performed as described by Jetté et al [21].

---

## RESULTS

Immunodetection of P-gp was performed using two different antibodies, mAb C219 (Fig. 2A) and pAb anti-mdr Ab-1 (Fig. 2B), both recognizing a conserved C-terminal linear sequence. P-gp was detected in whole tissue membranes and luminal membranes isolated from the capillary endothelium of brain, heart and lungs, and in brain capillaries. In brain tissues, it was enriched 17-fold in luminal membranes compared to capillaries and 400-500-fold over whole membranes (Table I). These results confirmed that P-gp is localized on the luminal side of the endothelial cells of the blood-brain barrier. P-gp was not enriched in the luminal membranes of heart capillaries and was only enriched 2-fold in those of the lung (Table I).

Since two proteins (p155 and p190 kDa) were detected by the mAb C219, deglycosylation and photoaffinity labelling with IAAP were performed to identify which protein was P-gp. First, deglycosylation of brain capillary proteins (Fig. 3) shifted the apparent molecular mass of p155 to 130 kDa, whereas that of p190 was only reduced by 5 kDa. The decrease of 25 kDa is in agreement with previous results [22], indicating that p155 is P-gp. Second, photoaffinity labelling with IAAP (Fig. 4) confirmed that p155 is P-gp, since it is photolabelled by IAAP, while p190 is not.

A brain capillary is seen in cross section in electron micrography (Fig. 5A). The capillary lumen (CL) is surrounded by the luminal membrane of endothelial cells (E). The luminal membrane is coated with electron-dense silica-polyanion which is seen as black dots. Electron microscopy also shows that the final preparation is almost exclusively composed of luminal membranes from capillaries coated with electron-dense silica-polyanion (Fig. 5B). Thus the method which was previously applied to isolate lung luminal membranes can be used successfully with other tissues than lung.

Luminal membrane preparations were further characterized by immunodetecting various membrane markers. Immunodetection of the glucose transporter GLUT-1 and



GFAP, an astrocyte related protein, was performed as a first control (Fig. 6A) to determine the cellular membrane type. Two different isoforms of GLUT-1 were detected. An isoform of 52 kDa was enriched 10-fold in brain capillary luminal membranes (Table I). This isoform is a good marker for endothelial cells of the brain since it is expressed selectively in the brain microvascular endothelium in both luminal and abluminal membranes [23]. Thus, enrichment of this isoform indicates that this preparation isolated from brain is vascular endothelium. Another GLUT-1 isoform of 45 kDa was detected in whole membranes and capillaries isolated from brain but not in luminal membranes from brain blood vessels. GLUT-1 was not detected in the luminal membranes of the endothelia from lungs and heart. This absence is not surprising since the vascular bed of these tissues is not a site of expression for this protein, according to immunohistochemical studies [24]. Immunodetection of GFAP (Fig. 6B) revealed two proteins of about 50 kDa in whole membranes, capillaries and capillary luminal membranes from brain. These proteins were weakly enriched in capillary luminal membranes from brain compared to brain capillaries (1.4-fold) and whole membranes (2.6-fold) (Table I). This indicates a minor contamination of the brain luminal membrane preparation by astrocytes. No GFAP was detected in capillary luminal membranes from heart or lung as expected. These results suggests that we have mainly plasmatic membranes of endothelial cells in luminal membrane preparations.

Contamination by internal membranes was evaluated by immunodetection of adaptin (Fig. 7A), a protein of the Golgi apparatus, and IP<sub>3</sub>R-3 (Fig. 7B), a protein located in the endoplasmic reticulum membrane. With anti-adaptin, two proteins which correspond to adaptin (105 and 110 kDa) were detected in the capillary luminal membranes, whole membranes and capillaries isolated from the brain. This protein was only weakly enriched in brain luminal membranes compared to brain capillaries (2.4-fold) and whole membranes from brain (3.5-fold) (Table I). Only one band was detected in the luminal membrane of capillaries and in whole membranes from heart and lungs. In heart, expression of adaptin

was weaker in capillary luminal membranes (0.2-fold) than in whole membranes in contrast with lung where it was enriched, but only 2.7-fold (Table I). IP<sub>3</sub>R-3 was detected as a protein of about 300 kDa in the three fractions isolated from brain. The enrichment for this protein in the luminal membranes, compared to whole membranes, was 9.2-fold (Table I). In contrast, this protein was expressed at lower levels in capillary luminal membranes than in brain capillaries (0.2-fold). In heart, no IP<sub>3</sub>R-3 was detected in capillary luminal membranes, while in lung, levels of IP<sub>3</sub>R-3 in capillary luminal membranes were very low compared to whole membranes (0.3-fold). These very low levels of adaptin and IP<sub>3</sub>R-3 in capillary luminal membrane preparations from the three tissues indicate a weak contamination by Golgi apparatus and endoplasmic reticulum membranes.

Contamination of capillary luminal membrane preparations by anti-luminal membranes and basal laminae was evaluated by immunodetection of integrin  $\alpha_v$  (Fig. 8A) and collagen IV (Fig. 8B). The integrin  $\alpha_v$  (125 kDa) was detected at very low levels in capillary luminal membranes and at higher levels in brain capillaries and whole membranes. In brain tissues, the expression in capillary luminal membranes was 0.4-fold that in brain capillaries and 0.3-fold that in whole membranes (Table I). In heart and lungs, the ratio of expression levels between capillary luminal membranes and whole membranes was only 0.2-fold. Thus, very little anti-luminal membranes contaminated the capillary luminal membrane preparations. Collagen IV (185 kDa) was found in capillary luminal membranes from the three tissues studied. In brain tissues, it was enriched 7.5-fold in capillary luminal membranes compared with whole membranes (Table I) but only 0.3-fold when compared with brain capillaries. In heart, the expression level was lower in capillary luminal membranes than in whole membranes (0.2-fold) and in lung the expression level was similar in both capillary luminal membranes and whole membranes. These lower detection levels, compared to brain capillaries and whole membranes from heart and lung, exclude a major contamination by basal laminae in all capillary luminal membrane preparations.

## DISCUSSION

Isolation of the luminal membranes from endothelial cells of blood vessels of the lung, devoid of blood cells, with high yield and purity was previously accomplished by Jacobson et al. [17]. This method takes advantages of the exposure of luminal membranes of the endothelial cells to coat them, by perfusion, with a layer of cationic colloidal silica which is then overcoated with a polyanion cross-linker. The density of the luminal membranes is thus changed, allowing their isolation by centrifugation. In this paper, the method was applied to lung, heart and brain.

The high level of P-gp expression and its strong enrichment in brain capillary luminal membranes confirmed its localization on the luminal side of endothelial cells forming the blood vessels of the brain. This also suggests a fundamental role for P-gp at this site. Possible involvement of P-gp in blood-brain barrier was previously demonstrated using various methods. Transport of vincristine by primary cultured bovine brain capillary endothelial cells, which is vectorial, suggests that P-gp functions as a drug efflux pump at the luminal side of the endothelial cells of brain capillaries [25]. This hypothesis is reinforced by the vectorial transport of cyclosporin A, suggesting a detoxifying role for P-gp [26]. Mice with a genetic disruption of class I P-gp accumulate higher levels of drugs in the brain, supporting that P-gp is involved in blood-brain barrier functions [27]. These results suggest that P-gp could contribute to multidrug resistance in brain tumors by blocking drug entry into the brain or in tumor cells.

Detection of P-gp in luminal membranes from lungs suggests that P-gp is also localized on the luminal side of the lung endothelium. However, the weak enrichment suggests that P-gp could also be located in other lung cells. In fact, the presence of P-gp in bronchial cells was previously reported [28]. In the heart, P-gp was detected in endothelial luminal membranes but it does not appear to be restricted to this region since it was not

enriched in luminal membranes. The detection of P-gp in the myocardium [28] may explain the absence of enrichment in the heart capillary luminal membranes.

Proteins other than P-gp, were studied as controls to evaluate the purity of luminal membranes preparations. The strong enrichment for GLUT-1 (55 kDa isoform) in luminal membranes from brain endothelium indicates that the material is vascular endothelium. The absence of the 45 kDa isoform indicates that the luminal membrane preparation is not contaminated with non-endothelial cells since this isoform was shown to be associated with non-endothelial cells [29]. However, the presence of the 45 kDa isoform in whole heart membranes and its absence in heart capillary luminal membranes was expected since it was previously demonstrated in cardiac myocytes [30,31]. This indicates that the heart capillary luminal membrane preparations did not have major contamination by myocytes.

Contamination of luminal membrane preparations by astrocytes, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, anti-luminal membranes and basal laminae was evaluated by immunodetection of GFAP, adaptin, IP<sub>3</sub>R-3, integrin  $\alpha$ v and collagen IV, respectively. Absence or very low enrichment of all these markers in the luminal membrane fractions from each tissue showed that the preparations did not have any major contamination by these membranes. Thus, the strong co-enrichment of P-gp (400-500-fold) and GLUT-1 (240-280-fold) in brain capillary luminal membranes compared to whole brain membranes versus low enrichment of other proteins as IP<sub>3</sub>R-3 (9.2-fold) and collagen IV (7.5-fold) and still lower enrichment for other markers show clearly that P-gp is mainly a luminal protein in the brain vascular endothelium.

In conclusion, in the lungs and heart, P-gp is present in endothelial luminal membranes but is not restricted to this site. In the brain endothelium, the luminal membrane seems to be the major site of P-gp expression. This localization of P-gp adds a new and important dimension for the tissue distribution of anti-cancer drugs, since it indicates that part of the multidrug resistance in the clinical treatment of cancer could

originate from the vascular endothelium, in addition to the induced expression of P-gp in the drug-resistant cancer cells.

---

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marie-France Bélanger and Julie Poirier for their technical support, and Vincent Vachon for his critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from Sandoz Canada Inc. Édith Beaulieu received a scholarship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

---

## REFERENCES

1. Ling, V., Kartner, N., Sudo, T., Siminovitch, L. and Riordan, J. R. (1983) *Cancer Treatment Rep.* 67, 869-874.
2. Georges, E., Sharom, F. J. and Ling, V. (1990) *Adv. Pharmacol.* 21, 185-215.
3. Doige, C. A. and Sharom, F. J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1109, 161-171.
4. Nielsen, D. and Skovsgaard, T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1139, 169-183.
5. Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.
6. Pastan, I. and Gottesman, M. M. (1991) *Annu. Rev. Med.* 42, 277-286.
7. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. and Willingham, M. C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7735-7738.
8. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R. and Bertino, J. R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 695-698.
9. Buschman, E., Arceci R. J., Croop, J. M., Che, M., Arias, I. M., Housman, D. E. and Gros, P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 18093-18099.
10. Smit, J. J. M., Schinkel A. H., Oude Elferink, R. P. J., Groen, A. K., Wagenaar E., van Deemter, L., Mol C. A. A. M., Ottenhoff, R., van der Lugt, N. M. T. and van Roon, M. A. (1993) *Cell* 75, 451-462.
11. Jetté, L., Têtu, B. and Béliveau, R. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1150, 147-154.
12. Jetté, L., Murphy, G. F., Leclerc, J.-M. and Béliveau, R. (1995a) *Biochem. Pharmacol.* 50, 1701-1709.

13. Schinkel, A. H., Smit, J. J. M., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, M. A., Mol, C. A. A. M., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., te Riele, H. P. J., Berns, A. J. M. and Borst, P. (1994) *Cell* 77, 491-502.
14. Sugawara, I., Hamada, H., Tsuruo, T. and Mori, S. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 727-730.
15. Tanaka, Y., Abe, Y., Tsugu, A., Takamiya, Y., Akatsuka, A., Tsuruo, T., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Sato, O., Tamaoki, N. and Nakamura, M. (1994) *Virchows Arch.* 425, 133-138.
16. Henson, J. W., Cordon-Cardo, C. and Posner, J. B. (1992) *J. Neuro-Oncol.* 14, 37-43.
17. Jacobson, B. S., Schnitzer, J. E., McCaffery, M. and Palade, G. E. (1992) *Eur. J. Cell Biol.* 58, 296-306.
18. Dallaire, L., Tremblay, L. and Béliveau, R. (1991) *Biochem. J.* 276, 745-752.
19. Beaulieu, E., Demeule, M., Pouliot, J.-F., Averill-Bates, D. A., Murphy, G. F. and Béliveau, R. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1233, 27-32.
20. Pouliot, J.-F. and Béliveau, R. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1234, 191-196.
21. Jetté, L., Pouliot, J.-F., Murphy, G. F. and Béliveau R. (1995b) *Biochem. J.* 305, 761-766.
22. Yoshimura, A., Kuwazuru, Y., Sumizawa, T., Ikeda, S.-I., Ichikawa, M., Usagawa, T. and Akiyama S.-I. (1989) *Biochim. et Biophys. Acta* 992, 307-314.



23. Farrell, C. L. and Pardridge, W. M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5779-5783.
  24. Baldwin, S. A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 17-46.
  25. Tsuji, A., Terasaki, T., Takabatake, Y., Tenda, Y., Tamai, I., Yamashima, T., Moritani, S., Tsuruo, T. and Yamashita, J. (1992) *Life Sci.* 51, 1427-1437.
  26. Shirai, A., Naito, M., Tatsuta, T., Dong, J., Hanaoka, K., Mikami, K., Ohhara, T. and Tsuruo, T. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1222, 400-404.
  27. Schinkel, A. H., Mol, C. A. A. M., Wagenaar, E., van Deemter, L., Smit, J. J. M. and Borst, P. (1995) *Eur. J. Cancer* 31A, 1295-1298.
  28. Pavelic, Z. P., Reising, J., Pavelic, L., Kelley, D. J., Stambrook, P. J. and Gluckman, J. L. (1993) *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 119, 753-757.
  29. Pardridge, W. M., Boado, R. J. and Farrell, C. R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 18035-18040.
  30. Santalucia, T., Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Nuel, A., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A. (1992) *Endocrinology* 130, 837-846.
  31. Kainulainen, H., Breiner, M., Schürmann, A., Marttinen, A., Virjo, A. and Joost, H. G. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1225, 275-282.
-

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** *Outline of the procedure used for the isolation of luminal membranes from endothelial cells.*

**Figure 2.** *Immunodetection of P-gp in luminal membranes.* After solubilization, proteins from whole membranes (WM) (30  $\mu$ g), endothelial luminal membranes (LM) from heart (30  $\mu$ g), lungs (30  $\mu$ g) and brain (3  $\mu$ g) and brain capillaries (Cap) (3  $\mu$ g) were resolved by SDS-PAGE. Immunodetection with mAb C219 (A) and pAb Ab-1 (B) was performed as described in the Materials and Methods section.

**Figure 3.** *Deglycosylation of P-gp from brain capillaries.* Solubilized brain capillary proteins were incubated 16 hours at 4°C in the presence (Endo F) or absence (Control) of endoglycosidase F/N-glycosidase F, as described in the Materials and Methods section. The samples and untreated brain capillary proteins (Untreated) were resolved by SDS-PAGE. Immunodetection with mAb C219 was performed as described in the Materials and Methods section.

**Figure 4.** *Photoaffinity labelling of P-gp in brain capillaries.* Brain capillary proteins (50  $\mu$ g) were incubated with IAAP, irradiated at 254 nm and immunoprecipitated with mAb C219 as described previously (Jetté et al, 1995b). Proteins were then resolved by SDS-PAGE. Gels were dried and exposed to kodak films (IAAP). Untreated brain capillary proteins (10  $\mu$ g) were resolved by SDS-PAGE and Western blot analysis was performed with mAb C219 as described in the Materials and Methods section (WB).

**Figure 5.** *Electron micrographs of luminal membranes from brain.* A. Cross-sectional view of brain capillary endothelial cells (E) after coating with cationized silica particles and polyanion cross-linker which surround the capillary lumen (CL). B. The final membrane preparation coated with electron-dense silica-polyanion which is seen as black dots.

**Figure 6.** *Determination of cellular membrane type.* A. After solubilization, proteins from whole membranes of each tissue (WM) (30  $\mu\text{g}$ ), endothelial luminal membranes (LM) from heart (30  $\mu\text{g}$ ), lungs (30  $\mu\text{g}$ ) and brain (3  $\mu\text{g}$ ) and brain capillaries (Cap) (3  $\mu\text{g}$ ) were resolved by SDS-PAGE. Immunodetection with pAb anti-GLUT-1 was performed as described in the Materials and Methods section. B. After solubilization, proteins from brain capillaries (Cap) (15  $\mu\text{g}$ ), whole membranes (WM) and luminal membranes (LM) from brain (15  $\mu\text{g}$ ), heart (30  $\mu\text{g}$ ) and lung (30  $\mu\text{g}$ ) capillaries were resolved by SDS-PAGE. Immunodetection with mAb anti-GFAP was performed as described in the Materials and Methods section.

**Figure 7.** *Immunodetection of intracellular membrane markers.* A. After solubilization, proteins from brain capillaries (Cap) (15  $\mu\text{g}$ ), whole membranes (WM) and luminal membranes (LM) from brain (15  $\mu\text{g}$ ), heart (30  $\mu\text{g}$ ) and lung (30  $\mu\text{g}$ ) capillaries were resolved by SDS-PAGE. Immunodetection with mAb anti-adaptin was performed as described in the Materials and Methods section. B. After solubilization, proteins from brain capillaries (Cap) (20  $\mu\text{g}$ ), whole membranes (WM) (20  $\mu\text{g}$ ) and luminal membranes (LM) from brain (20  $\mu\text{g}$ ), heart (15  $\mu\text{g}$ ) and lung (20  $\mu\text{g}$ ) capillaries were resolved by SDS-PAGE. Immunodetection with mAb directed against anti-IP<sub>3</sub>R-3 was performed as described in the Materials and Methods section.

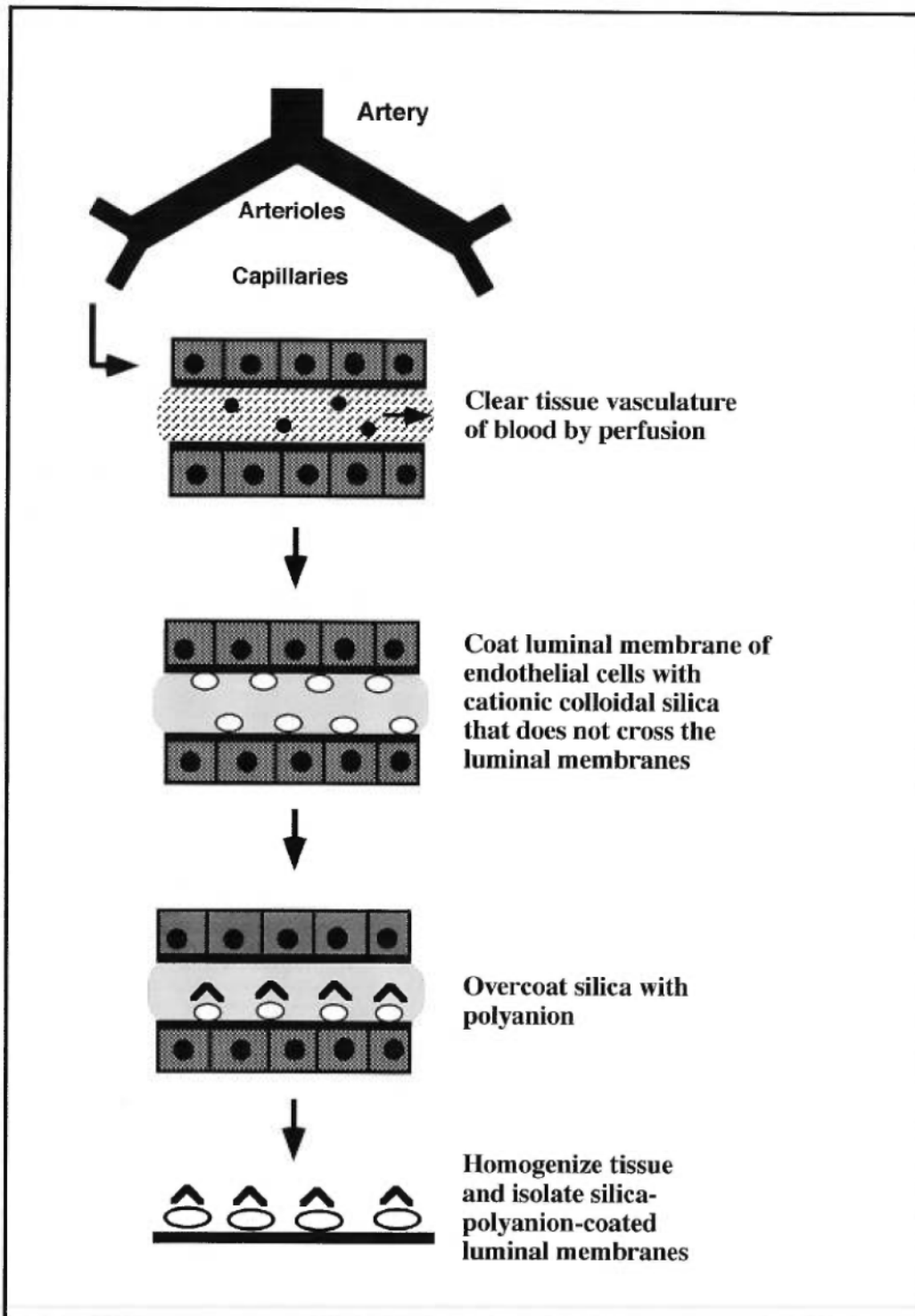
**Figure 8.** *Immunodetection of anti-luminal and basal membrane markers.* After solubilization, proteins from brain capillaries (Cap) (20  $\mu\text{g}$ ), whole membranes (WM) (20  $\mu\text{g}$ ) and luminal membranes (LM) from brain (20  $\mu\text{g}$ ), heart (15  $\mu\text{g}$ ) and lung (20  $\mu\text{g}$ ) capillaries were resolved by SDS-PAGE. Immunodetection with mAb 1960 directed against integrin  $\alpha\text{v}$  (A) and with mAb M3F7 directed against collagen IV (B) was performed as described in the Materials and Methods section.

**TABLE I**

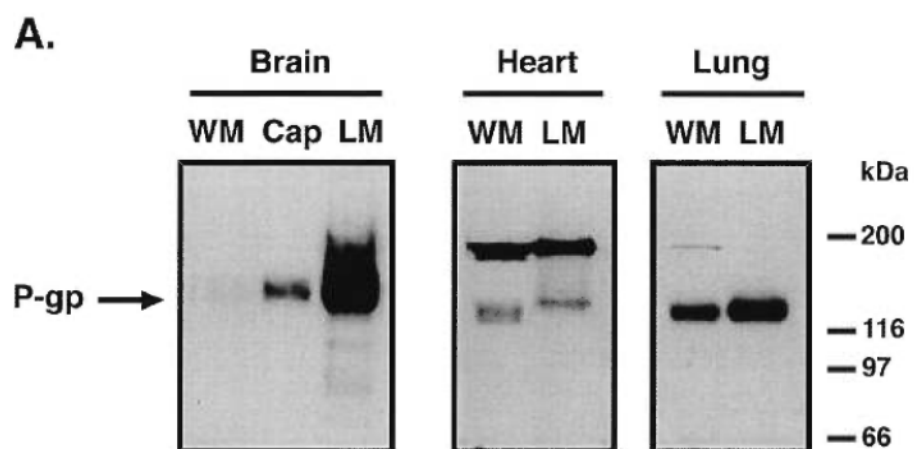
Enrichment of proteins in capillary luminal membranes compared to corresponding total membranes and to brain capillaries.

	Brain capillaries	Whole membranes of		
		brain	heart	lung
P-gp	17	400-500	1.2	2.2
GLUT-1	9.9	240-280	-	-
GFAP	1.4	2.6	-	-
Adaptin	2.4	3.5	0.24	2.7
IP <sub>3</sub> R-3	0.2	9.2	0	0.3
Integrin $\alpha$ v	0.4	0.3	0.2	0.2
Collagen IV	0.3	7.5	0.2	0.9

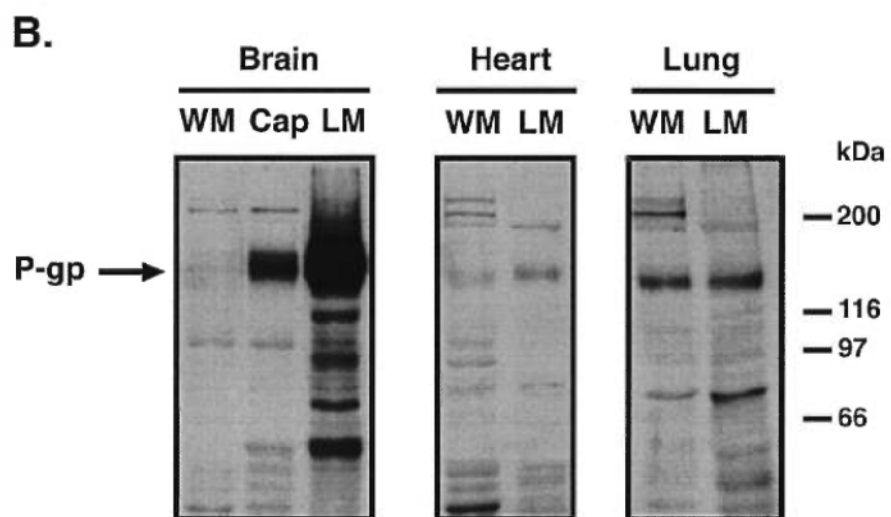
Autoradiograms were scanned with a laser densitometer and the relative area under each peak was calculated. Values are the ratio of the amount of protein detected in capillary luminal membranes and in isolated brain capillaries or whole membranes from corresponding tissue.



**Figure 1.** Outline of the procedure used for the isolation of luminal membranes from endothelial cells.



**Figure 2A. Immunodetection of P-gp in luminal membranes by mAb C219.**



**Figure 2B.** Immunodetection of P-gp in luminal membranes by pAb Ab-1.

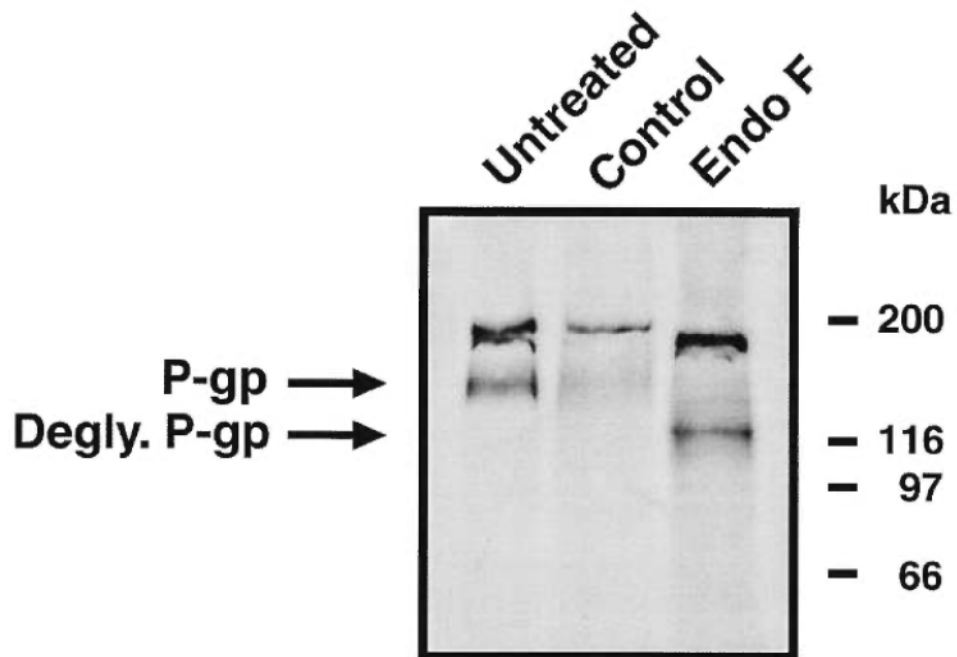
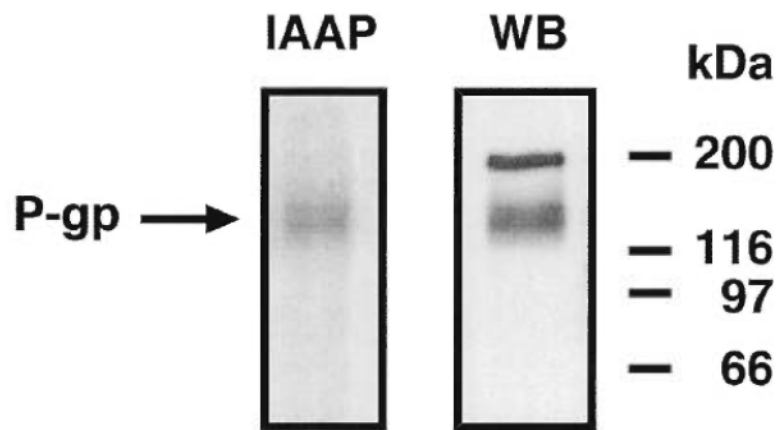


Figure 3. Deglycosylation of P-gp from brain capillaries.





**Figure 4. Photoaffinity labelling of P-gp in brain capillaries.**

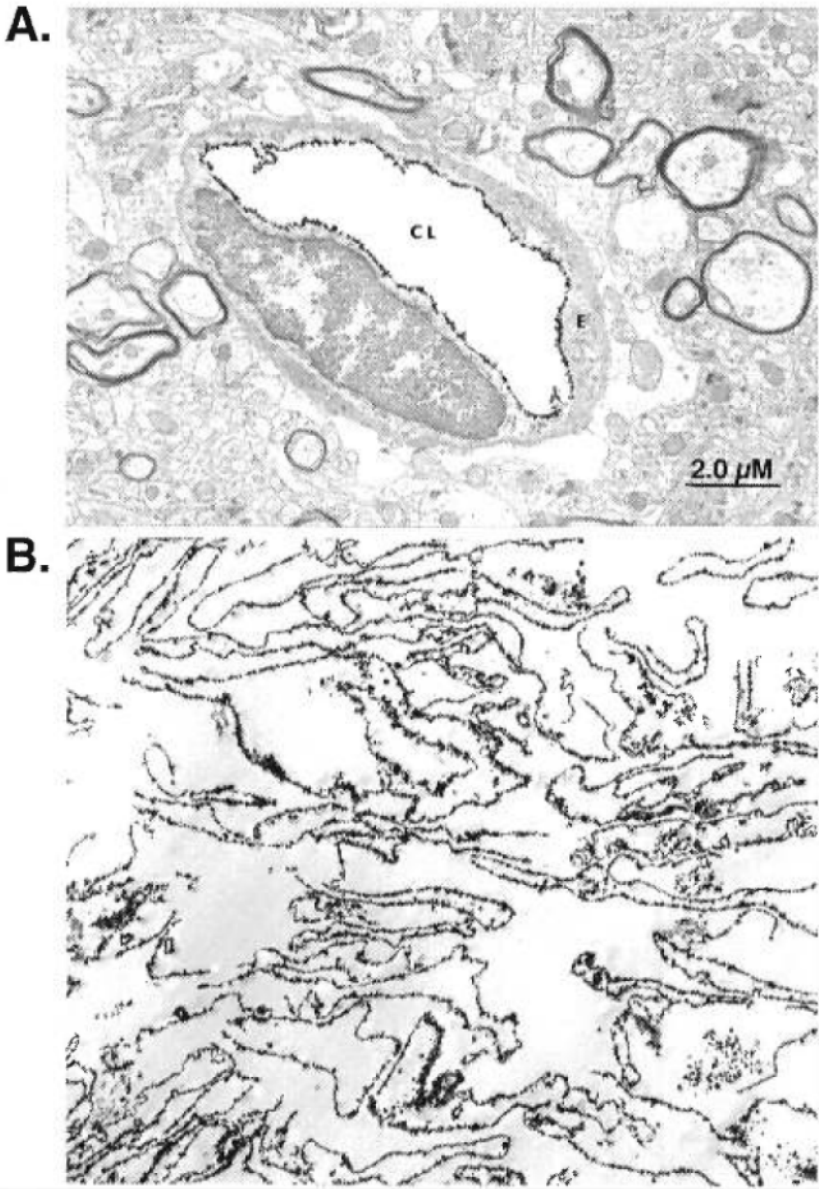
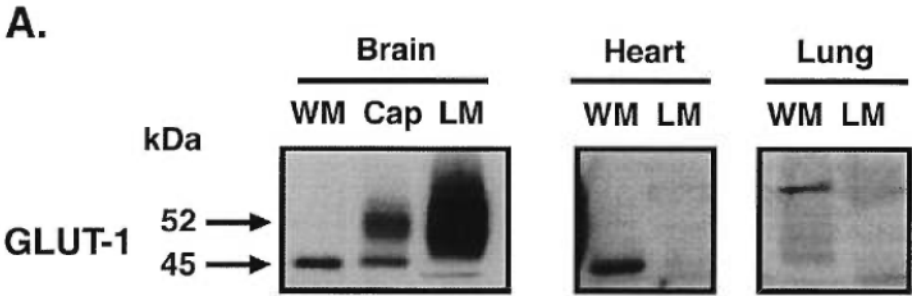
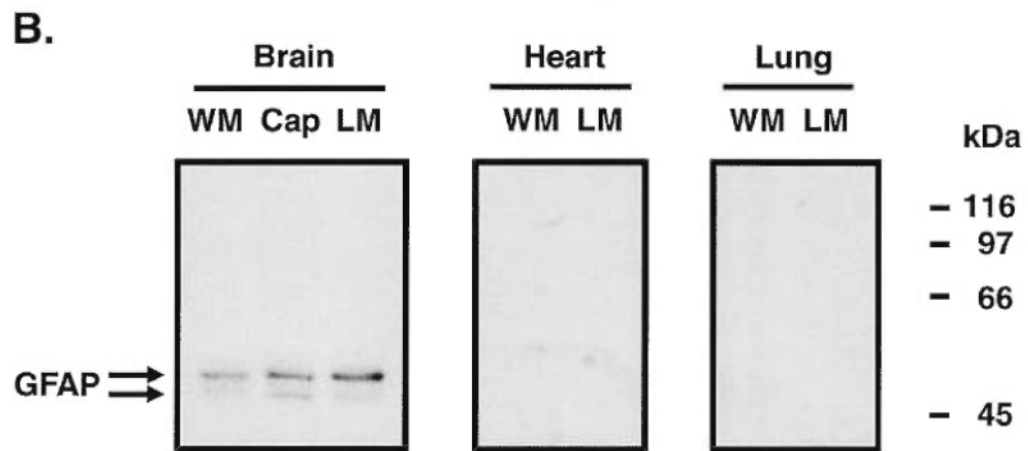


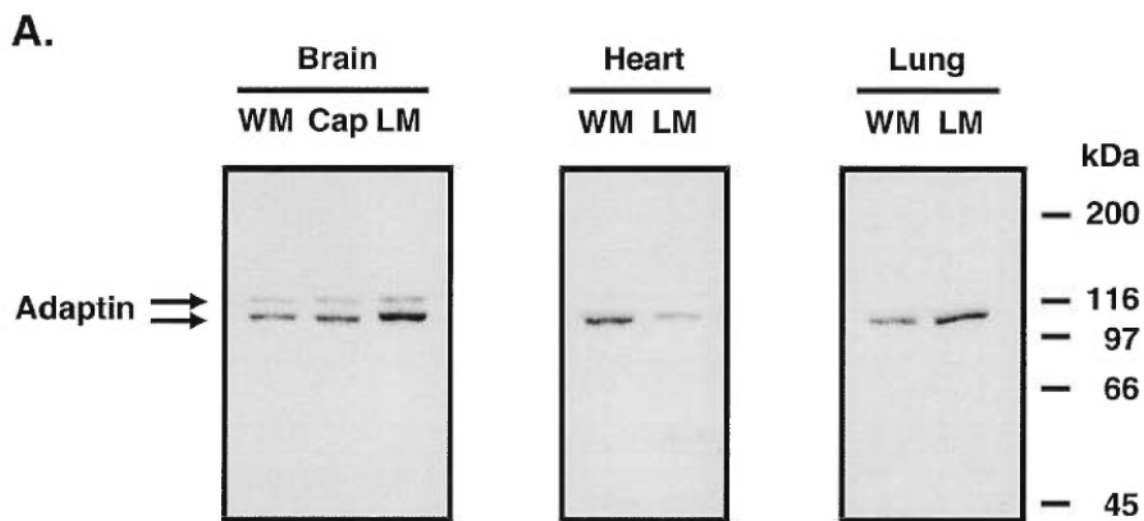
Figure 5. Electron micrographs of luminal membranes from brain.



**Figure 6A. Determination of cellular membrane type.**



**Figure 6B. Immunodetection of astrocytes marker.**



**Figure 7A. Immunodetection of Golgi apparatus membrane marker.**

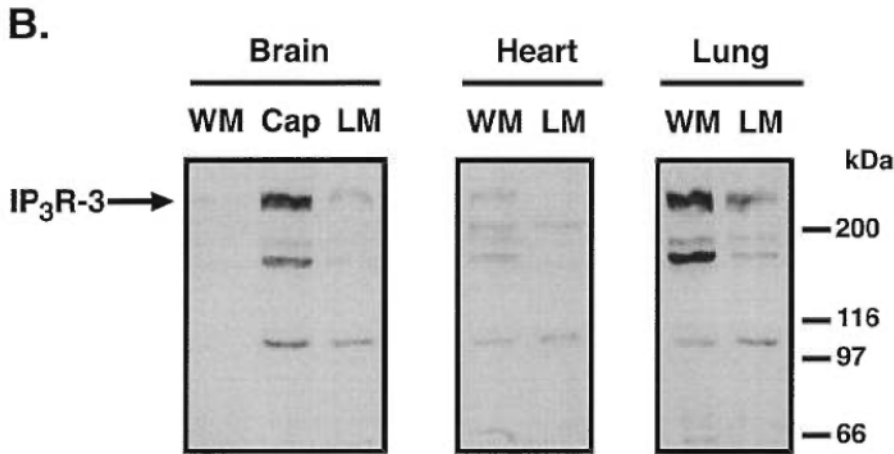
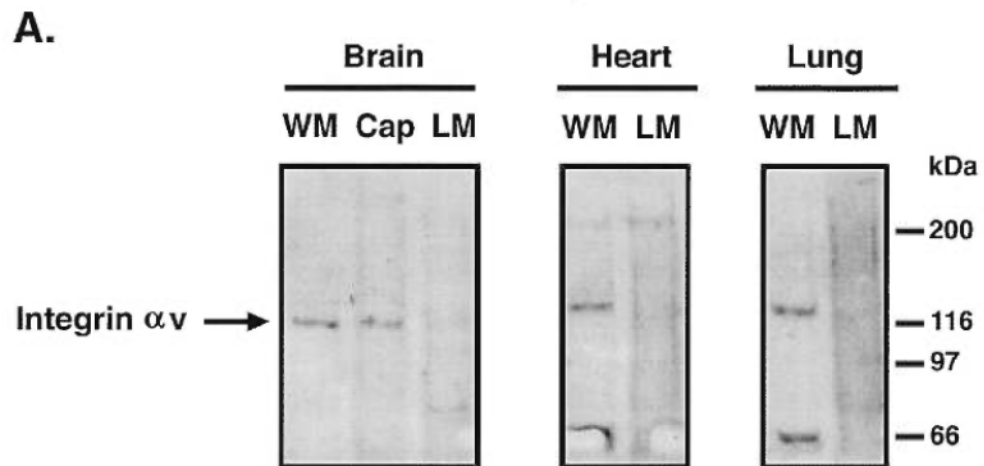
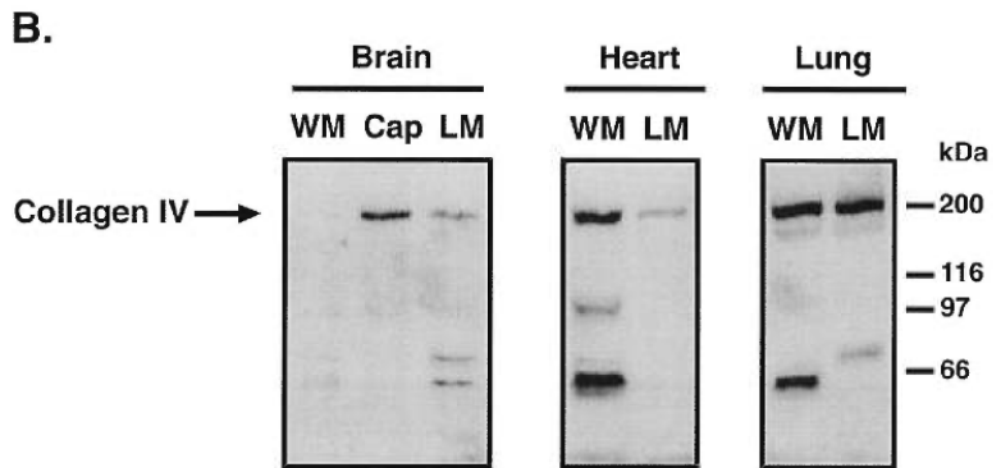


Figure 7B. Immunodetection of endoplasmic reticulum membrane marker.



**Figure 8A. Immunodetection of anti-luminal membrane marker.**



**Figure 8B.** Immunodetection of basal membrane marker.



## CHAPITRE III

### DISCUSSION

Bien que l'implication de la P-gp dans la résistance pléiotropique aux médicaments anticancéreux soit maintenant clairement établie, les fonctions physiologiques de cette protéine au niveau des tissus sains restent à être déterminées. Dans ces travaux, nous avons étudié l'expression de la P-gp dans de nombreux tissus sains provenant de cinq espèces différentes. Nous nous sommes attardés principalement aux capillaires cérébraux formant la barrière hémato-encéphalique où l'expression de la P-gp a été caractérisée biochimiquement au niveau des cellules entières de même qu'au niveau des membranes lumineales des cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins du cerveau. Les résultats obtenus suggèrent un rôle physiologique important pour la P-gp dont une implication dans la barrière hémato-encéphalique.

#### **3.1 La P-glycoprotéine des capillaires cérébraux, réactivité croisée de l'anticorps monoclonal C219**

La présence de la P-gp a été démontrée dans de nombreux tissus sains, dont les capillaires cérébraux où elle est fortement exprimée (Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Jetté *et al.*, 1993). L'anticorps monoclonal C219 est celui qui est le plus largement utilisé pour détecter la présence de la P-gp dans les tissus sains et tumoraux, autant chez l'humain que chez les animaux (Kartner *et al.*, 1985; Georges *et al.*, 1990a). Cet anticorps reconnaît les épitopes VQAALD et VQEALD retrouvés dans les régions cytosoliques situées après les sixième et douzième segments transmembranaires et qui sont conservés parmi les différentes classes et espèces. Toutefois, quelques réactivités croisées ont été signalées avec cet anticorps tel que mentionné précédemment (voir 1.8.2). Ainsi, au niveau des capillaires cérébraux,

deux protéines, de 155 kDa (p155) et de 190 kDa (p190), sont détectées par immunobuvardage de type Western avec l'anticorps monoclonal C219. La P-gp étant habituellement rapportée comme une protéine de 170 kDa, nous ne pouvions affirmer qu'une des deux bandes représentait la P-gp et éliminer l'autre. De plus, l'électrophorèse effectuée en conditions réductrices et fortement dénaturantes élimine la possibilité que deux protéines telle la P-gp et une autre protéine demeurent associées dans le gel. Afin de déterminer laquelle des deux bandes ou si les deux bandes représentent la P-gp, différents traitements physico-chimiques ont été effectués pour les caractériser et les comparer avec la P-gp des cellules tumorales CH<sup>R</sup>C5, provenant d'ovaires de hamsters chinois. Ces cellules ont été sélectionnées pour leur résistance à la colchicine qui est due à un haut niveau d'expression de P-gp.

Les différents paramètres analysés ont révélé que les deux protéines, la p155 et la p190, sont très différentes. Dans un premier temps, la sensibilité à la chaleur de la p155 et la p190 des capillaires cérébraux de rats et de boeufs a été examinée suite à une étape de chauffage avant l'électrophorèse. Dans les deux espèces, la p155 s'est avérée très sensible à ce traitement puisque son immunodétection est considérablement réduite par le chauffage tandis que la détection de la p190 n'est pas affectée. La P-gp des cellules CH<sup>R</sup>C5, détectée aux environs de 155 kDa, s'avère elle aussi sensible aux traitements de chauffage (Greenberger *et al.*, 1988). Une étape de chauffage avant l'électrophorèse diminue la mobilité électrophorétique et la quantité apparente de P-gp.

La deuxième partie des travaux a été d'établir un profil de solubilisation par différents détergents de la p155 et la p190 des capillaires cérébraux de rats et de les comparer avec celui de la P-gp des cellules CH<sup>R</sup>C5. Les patrons d'extraction obtenus sont très différents. Le seul détergent ayant permis de solubiliser la p190 est le SDS, un agent fortement dénaturant. Quand à la p155, elle est solubilisée par de nombreux détergents

avec des efficacités variables. De plus, elle est très bien solubilisée par quelques détergents qui solubilisent également la P-gp des CH<sup>R</sup>C5, suggérant qu'il s'agisse de la P-gp.

Une analyse de l'hydrophobicité des protéines des capillaires cérébraux de rats et de boeufs a été effectuée par le partitionnement des protéines dans le Triton X-114. L'utilisation de la technique de séparation de phase avec le Triton X-114 permet de fractionner les protéines selon leur hydrophobicité. Cette méthode utilise la propriété du Triton X-114 de se séparer en deux phases distinctes au dessus de 20°C. Lors de cette séparation, la phase aqueuse contient les protéines hydrophiles alors que la phase riche en détergent contient la majorité des protéines amphiphiles. L'application de cette méthode aux capillaires cérébraux de boeufs et de rats a permis la détection de la p155 dans la phase riche en détergent, indiquant qu'elle se comporte comme une protéine membranaire. Par contre, la situation est très différente pour la p190, celle-ci étant insoluble dans le Triton X-114. Cette absence de solubilisation, combinée au fait que le SDS semble être le seul détergent pouvant extraire la p190 des capillaires cérébraux suggère qu'il s'agit d'une protéine associée au cytosquelette. En effet, le caractère insoluble d'une protéine suite à une extraction avec un détergent non-ionique est généralement attribué à une protéine associée au cytosquelette (Sheng *et al.*, 1989).

La P-gp possède des sites potentiels de *N*-glycosylation sur la première boucle extra-cellulaire (Chen *et al.*, 1986; Gerlach *et al.*, 1986; Gros *et al.*, 1986b; Devault and Gros, 1990). Cette caractéristique a constitué le sujet d'une quatrième série d'expériences. Ainsi, pour caractériser la p155 et la p190 des capillaires cérébraux de rats, nous avons effectués la *N*-déglycosylation. Ce traitement a été effectué avec un mélange enzymatique d'endoglycosydase F/*N*-glycosydase-F. Ces enzymes clivent les liens *N*-glycosidiques, ce qui élimine les sucres liés aux asparagines. Les deux protéines reconnues par l'anticorps monoclonal C219 sont des glycoprotéines puisque la migration électrophorétique de la p155 et la p190 est affectée par un traitement avec de l'endoglycosydase F/*N*-glycosydase-

F. Toutefois, la différence de migration pour la p190 est beaucoup moindre (7-8 kDa) que pour la p155 (27-28 kDa). La variation de migration obtenue avec la P-gp des cellules CH<sup>R</sup>C5, suite à la déglycosylation, est similaire à celle de la p155, renforçant la possibilité que cette dernière soit la P-gp.

La cinquième étape consistait à faire compétition entre l'anticorps monoclonal C219 lors d'une immunodétection avec des protéines de capillaires cérébraux de rats ou de membranes de cellules CH<sup>R</sup>C5 et le peptide VQEALD. La concentration de peptide requise pour abolir la liaison de l'anticorps monoclonal C219 à la p155 est beaucoup plus faible que celle requise pour la p190. Avec la P-gp des cellules CH<sup>R</sup>C5, la concentration de peptide nécessaire à l'abolition de cette liaison était du même ordre que celle requise avec la p155 suggérant que seulement celle-ci soit la P-gp puisque si les deux bandes étaient de la P-gp, la liaison serait abolie par la même concentration de peptide. Ainsi, il n'est pas possible que p190 soit p155 ou la P-gp fortement associée à une protéine d'environ 45 kDa car la liaison de l'anticorps monoclonal C219 serait abolie à la même concentration que celle requise pour la P-gp.

Puis finalement, toujours dans le but d'identifier la P-gp, nous avons tenté d'immunoprécipiter la p155 et la p190 à l'aide de l'anticorps monoclonal C219. L'utilisation de cet anticorps nous a permis d'immunoprécipiter la P-gp des membranes de CH<sup>R</sup>C5 et la p155 des capillaires cérébraux. Toutefois, dans tous les essais, la p190 ne fut pas immunoprécipitée suggérant également que la p155 est la P-gp et que la p190 est une protéine différente de la P-gp.

---

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que la p155 est la P-gp puisqu'elle se comporte comme une protéine membranaire et possède des caractéristiques biochimiques très similaires à la P-gp des CH<sup>R</sup>C5. Les résultats démontrent également que la p190 est une protéine différente de la p155 et de la P-gp. Il semble plutôt s'agir d'une réactivité

croisée de l'anticorps monoclonal C219 avec une protéine de 190 kDa qui pourrait être une protéine du cytosquelette. Ce n'est pas la première réactivité croisée rapportée pour cet anticorps puisqu'il reconnaît entre autre la myosine (Thiebaut *et al.*, 1989) et quelques autres protéines qui ont été énumérées dans l'introduction (voir 1.8.2). La masse moléculaire de 190 kDa peut amener à croire que la p190 pourrait être la MRP, une autre protéine membranaire impliquée dans la résistance aux médicaments chimiothérapeutiques, puisqu'elle présente une certaine homologie de séquence avec la P-gp (voir 1.2.2). Cependant, la p190 se comporte différemment des protéines membranaires, suggérant qu'il ne s'agit pas de la MRP. De plus, bien que certains anticorps dirigés contre la MRP réagissent avec la P-gp (Krishnamachary and Center, 1993), l'analyse de la séquence de la MRP démontre que l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal C219 y est absent, suggérant également que la p190 est une protéine différente de la MRP.

L'identification de la p155 des capillaires cérébraux comme étant la P-gp peut s'avérer très intéressante pour des travaux futurs. Par exemple, le profil de solubilisation par différents détergents peut fournir des indices de départ très utiles, que ce soit pour obtenir des fractions enrichies en P-gp ou connaître les rendements de solubilisation dans des études de fonction de la P-gp avec des détergents tels le CHAPS ou l'octyl glucoside qui permettent de conserver son activité ATPasique (Doige *et al.*, 1993). Les résultats de solubilisation démontrent clairement qu'une étape d'extraction protéique par un détergent autre que le SDS peut s'avérer une méthode simple et efficace pour séparer complètement la P-gp de la p190. Ce paramètre peut donc être très utile pour la caractérisation de la P-gp des capillaires cérébraux.

---

En conclusion pour cette première partie, deux protéines, de 155 et 190 kDa, sont détectées par immunobuvardage de type Western avec l'anticorps monoclonal C219 dans les capillaires cérébraux. La caractérisation de ces deux protéines suggère fortement que la protéine détectée à 155 kDa représente la P-gp alors que la détection de la protéine de 190

kDa est reliée à un phénomène de réactivité croisée. Ainsi, l'anticorps monoclonal C219, qui est couramment utilisé pour détecter la présence de P-gp dans des échantillons tumoraux, dont des tumeurs cérébrales, reconnaît également une autre protéine. Cette réactivité croisée peut mener à des résultats de faux positifs dans le diagnostic du phénomène MDR.

### **3.2 Distribution tissulaire de la P-glycoprotéine par immunobuvardage de type Western.**

Après avoir démontré que la protéine détectée à 155 kDa au niveau des capillaires cérébraux par immunobuvardage de type Western est la P-gp, nous nous sommes intéressés à l'expression de la P-gp dans différents tissus. Nous avons effectué des immunodétections de type Western en utilisant différents anticorps monoclonaux (C219, C494 et JSB-1) et un anticorps polyclonal (Ab-1) dirigés contre différents épitopes de la P-gp (Tableau 1.3). Cette méthode a été choisie puisqu'elle permet de déterminer la masse moléculaire de chacune des protéines détectées et ainsi discriminer entre la P-gp et les interactions non-spécifiques des anticorps tel que nous l'avons démontré précédemment avec l'anticorps monoclonal C219. Ces travaux ont été effectués avec des préparations de membranes totales provenant de tissus d'humains, de hamsters, de rats, de lapins et de souris. Plusieurs études tissulaires, généralement par immunohistochimie, ont déjà été effectuées chez l'humain et quelques unes chez les animaux. Cependant, c'est la première fois que cinq espèces différentes sont étudiées en parallèle.

---

L'anticorps monoclonal C219 est celui qui a été principalement utilisé dans cette étude car il reconnaît toutes les classes de P-gp et cela, chez les cinq espèces étudiées (Georges *et al.*, 1990). Il reconnaît deux séquences de la P-gp, soit les acides aminés 568-574 et 1213-1219 (Georges *et al.*, 1990). Cet anticorps a permis de détecter la P-gp dans

presque tous les tissus étudiés d'humains, de hamster, de rat, de lapin et de souris avec quelques variations de masse moléculaire dues à des différences de glycosylation de la P-gp d'un tissu à l'autre. Il faut noter que la P-gp du pancréas a seulement été détectée chez le lapin. Toutefois, l'absence de détection dans certains tissus pour une ou plusieurs espèces, comme dans les reins chez le lapin ou le pancréas chez les autres espèces, ne signifie pas nécessairement que la P-gp est absente, son expression peut tout simplement être trop faible pour être détectée par la méthode employée. Ainsi, nous pouvons dire que la P-gp est exprimée de façon presque ubiquitaire parmi les tissus étudiés, ce qui suggère un rôle physiologique important pour cette protéine. Un autre élément suggérant l'importance de cette protéine est sa conservation entre les espèces, ce qui est bien représenté par nos résultats puisque nous avons détecté la P-gp avec l'anticorps monoclonal C219 chez les cinq espèces. De plus, des protéines ayant beaucoup d'homologie de structure et agissant de façon similaire à la P-gp sont présentes chez des espèces très éloignées des mammifères. Par exemple, Ste6 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (McGrath and Varshavsky, 1989), la protéine dérivée du gène *pmd1<sup>+</sup>* chez *Schizosaccharomyces pombe* (Nishi *et al.*, 1992), la protéine dérivée du gène *pfmdr1* chez le parasite *Plasmodium falciparum* (Ruetz *et al.*, 1996) et LmrA chez la bactérie *Lactococcus lactis* (van Veen *et al.*, 1996).

Le plus haut niveau d'expression de la P-gp est retrouvé dans les capillaires cérébraux. Étant donné le rôle crucial de ceux-ci dans la formation de la barrière hémato-encéphalique, cette forte expression suggère une implication physiologique et/ou pharmacologique très importante pour la P-gp au sein de cette structure. La P-gp de classe I, qui est la principale isoforme à ce niveau (Jetté *et al.*, 1995a), semble expulser les médicaments du cerveau vers la circulation sanguine (Schinkel *et al.*, 1994) tel que discuté précédemment (voir 1.4.3.2). Il a également été proposé que la P-gp agirait comme une pompe du côté luminal en expulsant les médicaments hors des cellules endothéliales, ce qui contrôlerait l'entrée des molécules lipophiles du sang vers le cerveau (Tsuji *et al.*, 1992).

Le haut niveau d'expression de P-gp dans les capillaires cérébraux semble en partie dû à la présence d'un facteur spécifique dans le cerveau. Cette hypothèse a été démontrée par le fait que la culture de cellules endothéliales en présence d'un extrait de cerveau augmente l'expression de la P-gp dans les cellules endothéliales alors que des extraits provenant de d'autres tissus ne provoquent pas de variations considérables (Tatsuta *et al.*, 1994). Cet élément appuie l'hypothèse d'un rôle de la P-gp dans la barrière hémato-encéphalique, il reflète l'importance pour le cerveau de se protéger des agressions externes, en limitant l'accès des substances lipophiles ou en les expulsant du cerveau vers le sang, tel que suggéré précédemment (Tsuji *et al.*, 1992; Schinkel *et al.*, 1994).

L'immunodétection de la P-gp avec l'anticorps monoclonal C219 a également révélé des protéines autres que la P-gp. Certaines réactivités croisées de cet anticorps ont déjà été rapportées avec une protéine de 190 kDa au niveau des capillaires cérébraux (Beaulieu *et al.*, 1995; Jetté *et al.*, 1995a) ainsi qu'avec la myosine (200 kDa) au niveau du muscle (Thiebaut *et al.*, 1989). Dans cette étude, ces deux protéines semblent avoir été détectées chez la plupart des espèces au niveau des capillaires cérébraux (190 kDa), au niveau du muscle squelettique et du coeur (myosine) et plus faiblement dans quelques autres tissus pour l'une ou l'autre. Toutefois, nous n'avons pas effectué de tests supplémentaires tel que l'immunodétection de la myosine pour vérifier s'il s'agissait des mêmes protéines puisque ce phénomène est déjà bien caractérisé. Ainsi, nous savons clairement que ces protéines dans la région de 200 kDa ne sont pas la protéine d'intérêt, soit la P-gp.

Nous avons également utilisé d'autres anticorps afin de corroborer les résultats obtenus avec l'anticorps monoclonal C219. L'anticorps polyclonal Ab-1 est dirigé contre un domaine cytoplasmique C-terminal, soit les acides aminés 1203-1224 de la P-gp humaine. Avec cet anticorps, l'immunodétection de la P-gp a été effectuée chez l'humain et le rat. Cet anticorps a démontré la présence de la P-gp, mais seulement dans les tissus où l'expression est la plus élevée selon les résultats obtenus avec l'anticorps monoclonal



C219, soit dans les intestins, le foie, les reins, les testicules, le coeur, les poumons et le cerveau. Ainsi, cet anticorps s'est avéré moins sensible que le C219 mais pourrait quand même être utilisé en clinique où il est préférable d'utiliser plus d'un anticorps pour effectuer le diagnostic du phénomène MDR. Toutefois, l'utilisation de l'anticorps monoclonal C219 et de l'anticorps polyclonal Ab-1 ne serait probablement pas suffisante pour un diagnostic puisque la région reconnue par l'Ab-1 englobe une des deux régions reconnues par le C219. Il serait plutôt préférable de confirmer le diagnostic avec un troisième anticorps. Un autre élément à considérer avec l'anticorps polyclonal Ab-1 est qu'il serait préférable d'utiliser une méthode déterminant les masses moléculaires afin d'éviter les faux positifs car cet anticorps reconnaît également quelques protéines non-spécifiques, mais qui sont différentes de celles reconnues par l'anticorps monoclonal C219.

Certains anticorps reconnaissent spécifiquement une ou des classes de la P-gp. Les anticorps monoclonaux JSB-1 et C494 sont dirigés contre des domaines cytoplasmiques de la P-gp de classe I chez l'humain et le hamster (Scheper *et al.*, 1988; Georges *et al.*, 1990a). La détermination du niveau d'expression de chacune des classes de la P-gp dans les différents tissus pourrait contribuer à déterminer le ou les rôle(s) physiologique(s) de cette protéine. Les anticorps monoclonaux C494 et JSB-1 fournissent d'intéressants résultats en immunohistochimie (Georges *et al.*, 1990a; van der Valk *et al.*, 1990). Toutefois, la méthode d'immunobuvardage de type Western ne semble pas suffisamment sensible pour utiliser ces anticorps avec des préparations de membranes totales de tissus. Avec l'anticorps monoclonal C494, la P-gp n'a pas été détectée dans aucun tissu mais sa fonctionnalité en immunobuvardage de type Western est démontrée par l'immunodétection de la P-gp dans les membranes de CH<sup>R</sup>C5 où cette protéine est surexprimée. Avec JSB-1, la P-gp a été détectée dans les reins humains, indiquant sa fonctionnalité avec la méthode employée, mais n'a pas été détectée dans aucun autre tissu. Les reins semblent donc le tissu où la P-gp de classe I est le plus fortement exprimée. Ainsi, les anticorps

monoclonaux C494 et JSB-1 sont fonctionnels en immunobuvardage mais leur sensibilité est beaucoup moindre que celle de l'anticorps monoclonal C219. Des résultats obtenus par cytométrie de flux démontraient, contrairement aux nôtres, que l'anticorps monoclonal JSB-1 semble plus sensible que le C219 (Lehne *et al.*, 1995). Cette discordance peut provenir de l'étape de perméabilisation de la membrane plasmique nécessaire en cytométrie de flux avec des anticorps dirigés contre des domaines cytoplasmiques des protéines. Elle peut également provenir du fait que l'anticorps monoclonal JSB-1 peut reconnaître des protéines autres que la P-gp, ce qui augmente le signal obtenu. Cette possibilité est appuyée par nos résultats obtenus avec JSB-1 puisque des protéines non spécifiques reconnues par cet anticorps fournissent un signal plus fort que la P-gp. En cytométrie de flux, où la masse moléculaire des protéines liées par l'anticorps est inconnue, on ne peut pas différencier entre le signal provenant de la P-gp et de d'autres protéines non spécifiques.

Bien que les anticorps monoclonaux C494 et JSB-1 ne soient pas suffisamment sensibles pour détecter la P-gp par la méthode utilisée dans cette étude, ces anticorps peuvent être très utiles en clinique puisqu'ils reconnaissent spécifiquement la classe I de P-gp, celle responsable de la résistance pléiotropique aux médicaments. L'utilisation de systèmes d'amplification du signal pourrait augmenter la sensibilité de la détection pour parvenir à mesurer l'expression de la P-gp, tout en discriminant les protéines reconnues selon leur masse moléculaire. Des systèmes d'amplification existent déjà pour augmenter le signal obtenu en immunohistochimie avec les anticorps monoclonaux C219, C494 et JSB-1 (Chan *et al.*, 1988; Tóth *et al.*, 1994). Il s'agit d'une méthode de détection de type "sandwich", c'est à dire une immunodétection par multicouches ou plusieurs anticorps sont utilisés en série. Des systèmes similaires pourraient être mis au point en immunobuvardage de type Western avec chacun des anticorps utilisés dans cette étude. Ainsi, des tests sensibles et exacts pourraient permettre de diagnostiquer le phénomène MDR, d'établir des

pronostics pour les patients atteints de cancers et possiblement d'adapter les traitements de chimiothérapie selon le niveau de résistance.

D'autres études de distribution de la P-gp dans les tissus humains ont été précédemment réalisées par d'autres équipes en utilisant l'immunohistochimie. Une de ces équipes a utilisé les trois anticorps monoclonaux C219, JSB-1 et MRK16 avec plusieurs tissus (van der Valk *et al.*, 1990). Les trois anticorps ont révélé un haut niveau d'expression de la P-gp dans le foie et les intestins, un faible niveau dans l'estomac et la rate, un très faible niveau dans les poumons, le cerveau et les reins et pas d'expression détectable dans les testicules. Le coeur, le pancréas et le muscle squelettique ont également été analysés dans cette étude mais les résultats variaient d'un anticorps à l'autre. Ces variations peuvent être dues au fait que JSB-1 reconnaît seulement la classe I de la P-gp, à une accessibilité différente des épitopes puisque l'anticorps MRK-16 reconnaît un épitope extracellulaire et que les deux autres anticorps sont dirigés contre des épitopes cytoplasmiques, ou au fait que l'anticorps C219 peut se lier à deux endroits différents de la P-gp. Leurs résultats obtenus avec l'anticorps monoclonal C219 sont très similaires aux nôtres à l'exception des intestins où ils ont détecté un haut niveau d'expression de la P-gp. Le faible niveau de détection que nous avons obtenu dans les intestins chez l'humain peut être causé par la grande quantité de protéases dans ce tissu qui ont pu protéolyser les protéines après la mort des patients. Des travaux de Pavelic *et al.* (1993) ont également fourni des résultats similaires à ceux de van der Valk *et al.* (1990) et aux nôtres, à l'exception de la rate où il n'ont pas détecté la P-gp et du cerveau où ils ont trouvé un haut niveau d'expression de P-gp.

---

Dans plusieurs tissus, le niveau d'expression de la P-gp varie considérablement d'une espèce à l'autre. Ces différences entre les espèces nous indiquent que les processus et réactions physiologiques sont différents d'une espèce à l'autre et qu'il faut être très prudent lorsque l'on transpose les résultats obtenus avec des animaux aux humains. Un

point particulier associé à la détection chez le hamster et la souris est le nombre de bandes non spécifiques supérieur à celui observé chez les autres espèces. Par contre, nous avons démontré que la plupart de ces bandes sont dues à l'anticorps secondaire utilisé. Celles-ci pourraient donc probablement être évitées en employant un anticorps secondaire différent ou une autre méthode de détection. En fait, il n'est pas habituel d'utiliser un anticorps primaire monoclonal préparé chez la souris pour détecter une protéine de souris. Toutefois, le C219 a été utilisé avec les tissus de souris car c'est le seul anticorps fonctionnel en immunobuvardage qui reconnaît avec certitude toutes les classes de P-gp chez la souris.

Les intestins constituent un des tissus où l'expression de la P-g est très variable d'une espèce à l'autre (voir tableau 1, manuscrit 2, page 90). Ces variations peuvent être dues, comme mentionné précédemment, à la présence de nombreuses protéases dans ce tissu et au taux de renouvellement très rapide des cellules. Ces deux éléments peuvent varier d'une espèce à l'autre et causer des différences dans l'expression des différentes protéines. La P-gp de classe I semble la principale isoforme exprimée dans ce tissu (Thiebaut *et al.*, 1987). Des études d'immunohistochimie suggèrent la localisation luminale de la P-gp dans les cellules épithéliales intestinales, ce qui amène l'hypothèse d'une fonction d'expulsion des toxines naturelles ou xénobiotiques (Thiebaut *et al.*, 1987). Cette possibilité est appuyée par des résultats de van Asperen *et al.* (1996) où des souris n'exprimant pas la P-gp éliminent moins rapidement la vinblastine non métabolisée dans les fèces.

Les reins sont parmi les tissus où l'expression de la P-gp est la plus variable puisqu'on la détecte fortement chez l'humain et le rat et pas du tout chez le lapin (voir tableau 1, manuscrit 2, page 90). Cette absence de détection chez le lapin peut être due, comme mentionné précédemment, à une expression trop faible pour être détectée par notre méthode. Une autre possibilité serait l'existence d'une autre classe de P-gp exprimée chez le lapin qui n'est pas reconnue par l'anticorps monoclonal C219. Il serait également

possible qu'une autre protéine exécute la même fonction que la P-gp au niveau du rein et module négativement son expression. La P-gp exprimée dans les reins est principalement de classe I et est localisée dans la membrane à bordure en brosse des tubules contournés proximaux, ce qui appuie un rôle de détoxification (Thiebaut *et al.*, 1987). Elle pourrait ainsi protéger l'organisme en excréant des composés toxiques dans l'urine.

Un haut niveau d'expression de P-gp a été détecté dans le foie de chaque espèce. Dans ce tissu, les classes I et III de la P-gp sont présentes. Il a été suggéré que la P-gp de classe I, qui est principalement exprimée à la surface des hépatocytes et des canalicules biliaires (Thiebaut *et al.*, 1987), fonctionne comme dans les intestins et les reins, en expulsant des agents toxiques dans la bile pour protéger l'organisme. Récemment, il a été démontré que la P-gp de classe III exprimée dans les membranes des canalicules biliaires serait impliquée dans la translocation des phospholipides, dont la phosphatidylcholine, dans la bile (Smit *et al.*, 1993; Ruetz and Gros, 1994; Oude Elferink *et al.*, 1996).

Les cellules endothéliales du cerveau et des testicules semblent le principal site d'expression de la P-gp dans ces deux tissus (Cordon-Cardo *et al.*, 1989). Ainsi, la détection de P-gp dans nos préparations de membranes totales de cerveaux et de testicules, qui est très faible mais constante d'une espèce à l'autre à l'exception des testicules chez le lapin, provient probablement des cellules endothéliales (voir tableau 1, manuscrit 2, page 90). La barrière sang-testicules ayant des propriétés similaires à la barrière hémato-encéphalique, la P-gp joue probablement un rôle similaire dans les testicules que celui discuté pour les capillaires cérébraux.

---

Pour la rate, le coeur, le thymus, le muscle squelettique et l'estomac, des tissus où l'expression de P-gp est variable (voir tableau 1, manuscrit 2, page 90), il n'y a pas de rôle physiologique clairement suggéré. Toutefois, la P-gp de classe I semble contribuer à la protection de ces tissus. En effet, des souris qui n'expriment pas cette isoforme, lorsque

traitées avec de l'ivermectine ou de la vinblastine, présentent une accumulation supérieure de ces xénobiotiques dans tous ces tissus (Schinkel *et al.*, 1994).

Nos résultats d'immunodétection de la P-gp dans les tumeurs démontrent clairement que l'expression de la P-gp est beaucoup plus faible dans celles-ci que dans les capillaires cérébraux. Il faut cependant noter que les capillaires cérébraux sont enrichis de 10 à 17 fois comparativement à un homogénat de cerveau tandis que pour les tumeurs, des préparations de membranes totales ont été utilisées. Toutefois, même en considérant les enrichissements des capillaires cérébraux et les différentes quantités de protéines utilisées pour l'immunodétection, l'expression de la P-gp est plus faible dans les tumeurs. En fait, une coloration des membranes de polyvinylidène difluorure utilisées pour l'immunodétection avec du bleu de coomassie, qui est plus sensible que le rouge de ponceau, a permis de visualiser que la quantité de protéines semblait équivalente entre les tumeurs et environ deux fois moindre dans les capillaires cérébraux. Cette coloration permettait également de s'assurer que les protéines tumorales n'étaient pas complètement dégradées par des protéases présentes dans les tumeurs car s'il y avait eu dégradation protéolytique, la P-gp aurait pu être présente dans la tumeur à l'origine mais ne pas être immunodéTECTÉE. L'ajout d'inhibiteurs de protéases aux échantillons tumoraux et l'ajout du tampon de dénaturation dès que les échantillons étaient décongelés semble avoir permis d'éviter la dégradation protéolytique.

Bien que l'expression de la P-gp ait été rapportée comme étant élevée dans certains types de tumeurs, dont les tumeurs cérébrales (Mousseau *et al.*, 1993), les neuroblastomes (Pastan and Gottesman, 1991; Ramani and Dewchand, 1995), les ostéosarcomes (Serra *et al.*, 1995), les lymphomes (Pastan and Gottesman, 1991; Kang *et al.*, 1995) ainsi que les tumeurs dérivées du foie (Pastan and Gottesman, 1991; Teeter *et al.*, 1993; Fardel *et al.*, 1994), elle semble plus faible dans les tumeurs que dans les tissus sains d'origine. C'est d'ailleurs ce qu'ont rapporté De Angelis *et al.* (1995) avec des carcinomes colorectaux.

C'est également ce que nos résultats démontrent puisque même dans les tumeurs cérébrales, l'expression de la P-gp est beaucoup plus faible que dans les capillaires cérébraux sains. Ainsi, malgré une expression de P-gp élevée dans quelques tumeurs, on ne peut généraliser et considérer qu'elle est élevée dans toutes les tumeurs. En fait, l'expression de la P-gp varie beaucoup entre les différents types de tumeurs ainsi qu'entre les tumeurs de même type (Sugawara, 1990; van der Valk *et al.*, 1990; Pileri *et al.*, 1991; De Angelis *et al.*, 1995). Ces variations sont très bien représentées par nos résultats puisque l'expression de la P-gp est très variable d'une tumeur à l'autre, qu'il s'agisse de tumeurs de même type ou de types différents qui ont été prélevées et analysées par la même méthode.

Selon nos résultats, le niveau d'expression de P-gp n'est pas plus élevé dans les tumeurs cérébrales, dont le neuroblastome et le médullosarcome, que dans les autres types de tumeurs, suggérant que les tumeurs cérébrales ne seraient pas plus résistantes à la chimiothérapie. Toutefois, le haut niveau d'expression de la P-gp dans les capillaires cérébraux empêche les médicaments chimiothérapeutiques d'atteindre les tumeurs cérébrales, diminuant ainsi l'efficacité des traitements anticancéreux.

Les différents niveaux d'expression de la P-gp peuvent être la cause de la très grande variabilité de succès des traitements de chimiothérapie. D'ailleurs, la corrélation entre l'expression de P-gp et la réussite des traitements chimiothérapeutiques a été démontrée avec des rhabdomyosarcomes, des sarcomes, des neuroblastomes et des ostéosarcomes (Baldini *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1994; 1995a; 1995b). Ainsi, la quantification de P-gp dans les tumeurs s'avère une étape très importante pour l'établissement d'un pronostic. L'expression de la P-gp devrait même être analysée tout au long des traitements de chimiothérapie puisque ceux-ci peuvent augmenter cette expression (Pastan and Gottesman, 1991; Hijazi *et al.*, 1994; Baldini *et al.*, 1995). Il serait toutefois nécessaire de mettre au point un test beaucoup plus sensible pour quantifier la P-gp, tout en

discriminant par la masse moléculaire pour éviter les faux positifs, puisque la quantité maximale de protéines de membranes totales de tumeurs qui peut être déposée sur le gel d'électrophorèse est de 30  $\mu\text{g}$ /puit dans les conditions utilisées pour cette étude. Si la quantité de protéines dans un puit est trop élevée, les protéines ne migrent pas correctement dans le gel et le test n'est plus valide car il n'est plus possible d'évaluer correctement le niveau d'expression de P-gp présente dans l'échantillon.

L'utilisation d'agents modulant la P-gp lors de traitements de chimiothérapie semble une avenue très intéressante pour améliorer l'efficacité des traitements (Miller *et al.*, 1991; Hegewisch-Becker, 1996). Toutefois, le haut niveau d'expression de P-gp dans de nombreux tissus sains indique que l'utilisation d'agents modulateurs devra être rigoureusement contrôlée. En fait, les agents modulateurs pourraient entraîner des effets secondaires importants. L'expression de la P-gp étant la plus élevée dans les capillaires cérébraux, où elle semble impliquée dans la barrière hémato-encéphalique, le cerveau pourrait être le tissu le plus sensible aux agents chimiosensibilisants. Par exemple, des effets secondaires neurologiques pourraient s'avérer très dommageables si on inhibe l'activité de la P-gp. Un de ces effets à d'ailleurs été déjà observé avec le SDZ PSC 833 qui provoque de l'ataxie (Boote *et al.*, 1996). Contrairement à son analogue, le SDZ PSC 833, la cyclosporine A ne semble pas provoquer de tels résultats.

En conclusion à cette section, la P-gp est exprimée dans la plupart des tissus humains et animaux de différentes espèces, suggérant un ou des rôle(s) physiologique(s) très importants, particulièrement au niveau des capillaires cérébraux où elle est le plus fortement exprimée. On retrouve également la P-gp dans quelques tumeurs, mais à des niveaux d'expression très variables. La mise au point d'un test consensus pour évaluer l'expression de la P-gp s'avère donc nécessaire, mais une attention spéciale devra être portée au choix de la méthode et du ou des anticorps employés s'il s'agit d'une méthode d'immunodétection.



### 3.3 Expression de la P-glycoprotéine dans les membranes lumineales des capillaires cérébraux

Après avoir démontré clairement que la P-gp est exprimée dans la plupart des tissus sains, nous nous sommes intéressés à sa localisation cellulaire en regardant son expression dans les membranes lumineales des cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins du cerveau, du coeur et des poumons. La localisation précise de la P-gp peut s'avérer très importante pour l'étude de sa ou ses fonction(s) physiologique(s).

Les membranes lumineales de cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins des poumons ont été auparavant isolées par l'équipe de Palade avec un haut rendement et un haut niveau de pureté (Jacobson *et al.*, 1992). Cette méthode profite du fait que les membranes lumineales des cellules endothéliales sont exposées à la lumière des vaisseaux sanguins. Il est donc possible, par perfusion, de recouvrir les membranes lumineales de silice colloïdale cationique qui peut être par la suite recouverte d'un polyanion formant ainsi un réseau. Ces étapes modifient considérablement la densité des membranes lumineales, ce qui permet de les isoler par centrifugation différentielle. Dans notre étude, cette méthode a été appliquée aux vaisseaux sanguins des poumons, du coeur et du cerveau. Ce dernier présente un intérêt particulier puisque les capillaires cérébraux constituent un important site d'expression de la P-gp qui semble être impliquée dans la barrière hémato-encéphalique.

Le très haut niveau d'expression de la P-gp et son très fort enrichissement dans les membranes lumineales des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du cerveau confirment sa localisation du côté luminal des capillaires cérébraux. Cette localisation et le très haut niveau d'expression, suggèrent un rôle fondamental de la P-gp à ce site. D'ailleurs, de plus en plus de travaux démontrent une implication possible de la P-gp dans la barrière hémato-encéphalique (voir 1.7.2.1 et 1.7.2.2), hypothèse qui est appuyée par la

localisation luminale. Des travaux avec des cellules endothéliales en culture, qui expriment la P-gp du côté apical, suggèrent que la P-gp pourrait participer activement à la protection et même à la détoxification du cerveau en expulsant des agents xénobiotiques des cellules endothéliales ou du cerveau vers la circulation sanguine. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que ces cellules sont résistantes à différents agents chimiothérapeutiques et que cette résistance diminue en présence d'agents chimiosensibilisants ou d'anticorps dirigés contre la P-gp (Hegmann *et al.*, 1992; Tatsuta *et al.*, 1992; Tsuji *et al.*, 1992). De plus, ces cellules effectuent le transport vectoriel, du côté basal vers le côté apical, de vincristine et de cyclosporine A via la P-gp (Tsuji *et al.*, 1992; Shirai *et al.*, 1994).

L'implication possible de la P-gp dans la barrière hémato-encéphalique est également mise en évidence par des travaux *in vivo*. La génération de souris n'exprimant pas la P-gp de classe I (mutante *mdr1a<sup>-</sup>*) a grandement contribué à ce point (Schinkel *et al.*, 1994). Ces souris sont viables mais sont beaucoup plus sensibles à des médicaments chimiothérapeutiques ou autres xénobiotiques que les souris normales (Schinkel *et al.*, 1994, 1995a; 1995b). La barrière hémato-encéphalique de ces souris semble déficiente puisqu'au niveau du cerveau, l'accumulation de ces agents xénobiotiques est augmentée de plusieurs fois (Schinkel *et al.*, 1994, 1995a; 1995b). Ces travaux suggèrent que la P-gp, par son implication dans la barrière hémato-encéphalique, pourrait contribuer à la résistance à la chimiothérapie des tumeurs cérébrales en empêchant les médicaments chimiothérapeutiques d'atteindre les tumeurs primaires ou les métastases.

L'immunodétection de la P-gp dans les membranes lumineales des cellules endothéliales des poumons suggère qu'elle est également localisée du côté luminal des vaisseaux sanguins pulmonaires. Toutefois, le faible enrichissement obtenu suggère que la P-gp pourrait également être présente dans d'autres cellules pulmonaires. La P-gp a d'ailleurs été détectée au niveau des cellules bronchiques (Pavelic *et al.*, 1993), ce qui peut expliquer que le niveau de P-gp détectée dans la préparation de membranes totales de

poumons est supérieur à la quantité détectée dans la préparation de membranes totales de cerveau où elle est principalement localisée au niveau des cellules endothéliales (Cordon-Cardo *et al.*, 1989). Ainsi, les cellules bronchiques étant éliminées lors de la purification des membranes lumineales des poumons, nous ne pouvons mesurer un fort enrichissement de la P-gp puisqu'une grande quantité de celle-ci est rejetée.

Dans les membranes lumineales des cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins du coeur, la P-gp a également été détectée mais elle n'est pas enrichie. La P-gp ne semble donc pas restreinte à ce site. En fait, la présence de la P-gp a déjà été démontrée dans les cellules du myocarde (Pavelic *et al.*, 1993), ce qui peut justifier une plus forte expression de P-gp dans les préparations de membranes totales de coeur que de cerveau. Ceci pourrait expliquer l'absence d'enrichissement au niveau des membranes lumineales puisque les cellules du myocarde sont éliminées lors de la purification, rejetant du même coup une importante quantité de P-gp.

L'enrichissement des membranes lumineales des cellules endothéliales du cerveau n'a pu être mesuré puisqu'il n'y a pas de marqueurs pour ces membranes dont nous aurions pu effectuer l'immunodétection. Alors, l'expression de quelques autres protéines a été analysée afin d'évaluer la pureté des membranes lumineales de chacun des tissus étudiés plutôt que de mesurer un enrichissement des membranes lumineales. La première étape a été de déterminer si les préparations de membranes lumineales de cerveau étaient constituées de matériel provenant de cellules endothéliales en procédant à l'immunodétection du transporteur de glucose GLUT-1. Il existe différentes isoformes de GLUT-1 qui dans certains cas, sont exprimées dans des types de cellules spécifiques. Ainsi, l'expression des différentes isoformes peut nous renseigner sur la nature des membranes retrouvées dans nos préparations. Un fort enrichissement de l'isoforme de 55 kDa dans la préparation de membranes lumineales des vaisseaux sanguins du cerveau a confirmé qu'il s'agit bien de membranes de cellules endothéliales. De plus, l'absence de l'isoforme de 45 kDa démontre

que la préparation n'est pas contaminée, ou seulement très peu par des cellules autres qu'endothéliales car cette isoforme est associée avec les cellules non-endothéliales (Pardridge *et al.*, 1990). L'immunodétection de GLUT-1 dans les préparations de membranes totales et de membranes lumineales de cellules endothéliales du coeur fournit également d'intéressants résultats. La présence de l'isoforme de 45 kDa a été démontrée dans les myocytes cardiaques (Santalucia *et al.*, 1992; Kainulainen *et al.*, 1994). Ainsi, l'absence de GLUT-1 dans la préparation de membranes lumineales des vaisseaux sanguins du coeur indique qu'il n'y a pas ou peu de contamination par les myocytes cardiaques.

La contamination des préparations de membranes lumineales par les astrocytes, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, les membranes anti-lumineales et la lame basale a été évaluée par l'immunodétection respective de GFAP, l'adapline, l'IP<sub>3</sub>R-3, l'intégrine  $\alpha_v$  et le collagène IV. L'absence ou un très faible enrichissement de tous ces marqueurs dans les préparations de membranes lumineales de cellules endothéliales de cerveau, de coeur et de poumons démontre qu'elles ne présentent pas de contaminations majeures par ces diverses membranes. Ainsi, deux protéines sont fortement coenrichies dans les membranes lumineales des capillaires cérébraux par rapport aux membranes totales de cerveau, soit la P-gp (400-500 fois) et GLUT-1 (240-280 fois). Pour toutes les autres protéines, la situation est différente puisqu'IP<sub>3</sub>R-3 et le collagène sont seulement enrichis 9,2 et 7,5 fois respectivement, et les autres marqueurs sont encore moins enrichis. Ces résultats démontrent clairement que dans le cerveau, la P-gp est principalement exprimée du côté luminal des cellules endothéliales formant les capillaires sanguins.

En conclusion pour cette dernière partie, la P-gp est présente au niveau des membranes lumineales des vaisseaux sanguins des trois tissus étudiés. Dans le coeur et les poumons, la P-gp ne semble pas restreinte à ce site. Par contre, dans le cerveau, les membranes lumineales des cellules endothéliales semblent le site majeur d'expression de la P-gp. Cette localisation lumineale de la P-gp dans les trois tissus étudiés est un élément très

important à considérer lors de traitements de chimiothérapie puisqu'il est probable qu'on puisse retrouver de la P-gp dans les membranes lumineales des cellules endothéliales des autres tissus qui ne font pas partie de cette étude. En fait, elle peut moduler négativement la distribution d'agents anti-cancéreux dans certains tissus en agissant au niveau des cellules endothéliales de ceux-ci. Ainsi, la P-gp peut diminuer la concentration de médicaments atteignant les cellules tumorales en plus d'agir au niveau des cellules cancéreuses elles-mêmes.

---

## CHAPITRE IV

### CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES

Nos travaux ont permis de démontrer que la bande détectée à 155 kDa par immunobuvardage de type Western dans les capillaires cérébraux avec l'anticorps monoclonal C219 est la P-gp. De plus, nous avons démontré la présence d'une réactivité croisée entre cet anticorps et une protéine de 190 kDa qui ne semble pas reliée au phénotype MDR. Cette protéine pourrait donc être la cause de faux positifs lors d'analyses cliniques qui ne discriminent pas la P-gp par sa masse moléculaire.

Nous avons démontré la présence de la P-gp par immunobuvardage de type Western dans presque tous les tissus, qu'ils soient humains ou animaux. Ceci suggère un rôle physiologique très important pour cette protéine. Les capillaires cérébraux constituent l'endroit où la P-gp est le plus fortement exprimée, ce qui favorise l'hypothèse de son implication dans la barrière hémato-encéphalique. L'anticorps monoclonal C219 semble être le plus sensible parmi les anticorps disponibles commercialement qui sont dirigés contre des épitopes linéaires. C'est le seul anticorps qui permet de détecter la P-gp dans presque tous les tissus. L'immunobuvardage de type Western s'avère une méthode de choix pour analyser l'expression de la P-gp car il permet de détecter la P-gp selon sa masse moléculaire et ainsi éviter les faux-positifs.

Nous avons également démontré que les membranes lumineales des cellules endothéliales des capillaires cérébraux semblent représenter le principal site d'expression de la P-gp dans le cerveau. Ainsi, l'implication de la P-gp dans la barrière hémato-encéphalique est très probable. Il est possible que la P-gp contribue à la résistance à la chimiothérapie des tumeurs cérébrales en empêchant les médicaments chimiothérapeutiques d'atteindre les cellules tumorales. La P-gp est également exprimée dans les membranes

luminales des vaisseaux sanguins du coeur et des poumons mais ne semble pas restreinte à ce site dans ces tissus. Cette localisation vasculaire de la P-gp, malgré une expression moins forte que dans les capillaires cérébraux, pourrait affecter la distribution tissulaire des médicaments chimiothérapeutiques. La P-gp peut diminuer la quantité de médicaments atteignant les tissus où elle est présente dans les membranes lumineales des cellules endothéliales et ainsi moduler négativement leur efficacité.

Suite à ces travaux, différentes avenues de recherche pourraient s'avérer très intéressantes. Un premier élément serait de déterminer le niveau d'expression de chacune des classes de P-gp dans les différents tissus que nous avons étudiés précédemment. Ces informations pourraient fournir des indices sur les fonctions physiologiques de chacune des classes de P-gp. Ces informations pourraient également nous aider à comprendre pourquoi certains types de tumeurs répondent mieux que d'autres aux traitements de chimiothérapie. Pour parvenir à ces résultats, il faudrait générer des anticorps, fonctionnels en immunobuvardage, dirigés contre des épitopes différant d'une classe à l'autre. Ces anticorps pourraient être générés chez des lapins en leur injectant des peptides synthétiques dont la séquence proviendrait de domaines spécifiques à chaque classe de P-gp chez le rat.

Certains travaux ont démontré que des traitements de chimiothérapie peuvent induire ou augmenter l'expression de la P-gp dans les cellules tumorales. La P-gp étant exprimée dans la plupart des tissus sains, il serait très intéressant de déterminer dans quels tissus et à quelles proportions, les traitements anticancéreux induisent son expression. Nous pourrions traiter des rats en santé avec des agents chimiothérapeutiques, seuls ou en combinaison de deux ou plusieurs, en reproduisant les conditions utilisées en cliniques. À la fin des traitements, les rats seraient sacrifiés et leurs organes seraient prélevés pour effectuer des préparations de membranes totales et/ou de capillaires cérébraux dans le cas du cerveau. Nous pourrions alors analyser par immunobuvardage de type Western les effets de ces médicaments sur l'expression de la P-gp. Suite aux traitements, la

fonctionnalité de la P-gp dans les capillaires cérébraux et autres tissus pourrait être analysée par des études de photomarquage avec de l' $[^{125}\text{I}]$ jodoaryl azidoprazosin. Il serait également intéressant, suite à ces traitements, de déterminer quelle(s) classe(s) de P-gp est ou sont influencée(s) dans chacun des tissus. Cette identification serait possible si nous arrivons à générer des anticorps fonctionnels contre chacune des classes. Tous ces travaux fourniraient des renseignements très utiles en clinique pour déterminer les traitements appropriés. De plus, ces travaux nous procureraient des informations importantes pour comprendre pourquoi certaines tumeurs répondent mieux à certains médicaments chimiothérapeutiques que d'autres.

Une autre voie intéressante de recherche serait l'analyse des interactions de la P-gp avec des médicaments chimiothérapeutiques ou des agents modulateurs de la P-gp. Ces interactions pourraient être étudiées au moyen du BIAcore qui permet d'analyser des interactions protéine-ligand en temps réel. Différentes stratégies sont envisagées afin de mesurer l'interaction entre la P-gp et certains médicaments. Par exemple, nous pourrions immobiliser un anticorps dirigé contre la P-gp puis regarder si l'interaction entre la P-gp et un médicament modifie la liaison avec l'anticorps. Les résultats de ces travaux pourraient avoir une implication clinique significative car si certains médicaments n'interagissent pas du tout avec la P-gp, ils ne seront peut-être pas expulsés des cellules cancéreuses et pourraient s'avérer plus efficaces. Les analyses avec des agents modulateurs pourraient également nous permettre de découvrir des agents qui se lieraient à la P-gp et l'empêcheraient de pomper les médicaments hors des cellules.

Pour terminer, il semble crucial d'établir un système de détection de la P-gp dans les tumeurs afin d'établir un pronostic fiable et de déterminer le traitement adéquat à effectuer. Ce test pourrait utiliser la méthode d'immunobuvardage de type Western qui permet d'éliminer les faux positifs. Toutefois, l'expression de P-gp dans les tumeurs semblant plus faible que dans les tissus sains, il faudrait amplifier le signal. Une méthode



de détection "multicouche" où plusieurs anticorps sont utilisés un après l'autre, un peu comme un sandwich, a déjà été utilisée par Tóth *et al.* (1994) avec l'anticorps monoclonal JSB-1 en immunohistochimie. Cette méthode pourrait être adaptée à la technique d'immunobuvardage de type Western avec l'anticorps monoclonal C219 ainsi qu'avec d'autres anticorps pour confirmer les résultats obtenus avec le premier anticorps. Une étape de solubilisation des protéines dans des conditions mises au point pour extraire efficacement la P-gp permettrait d'éliminer quelques protéines. Les risques de faux positifs seraient alors diminués si on utilise des techniques autres que l'immunobuvardage de type Western.

Les résultats de tous ces travaux pourraient éventuellement constituer une ou des armes supplémentaires dans le combat contre le cancer. Ainsi, j'espère que mes collègues et peut-être moi-même, à travers ce projet de recherche ou autres travaux sur le cancer, parviendront à redonner quelques sourires et lumières au fond des yeux d'enfants et d'adultes en leur permettant de vaincre cette terrible maladie.

---

## CHAPITRE V

## RÉFÉRENCES

Abe, T., Hasegawa, S., Taniguchi, K., Yokomizo, A., Kuwano, T., Ono, M., Mori, T., Hori, S., Kohno, K. and Kuwano, M. 1994. Possible involvement of multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells. *Int. J. Cancer* 58, 860-864.

Aftab, D.T., Yang, J.M. and Hait, W.N. 1994. Functional role of phosphorylation of the multidrug transporter (P-glycoprotein) by protein kinase C in multidrug-resistant MCF-7 cells. *Oncol. Res.* 6, 59-70.

Al-Shawi, M.K., Urbatsch, I.L. and Senior, A.E. 1994. Covalent inhibitors of P-glycoprotein ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 269, 8986-8992.

Anderegg, R.J., Betz, R., Carr, S.A., Crabb, J.W. and Duntze, W. 1988. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* mating hormone a factor. Identification of S-farnesyl cysteine as a structural component. *J. Biol. Chem.* 263, 18236-18240.

Anderson, M.P., Gregory, R.J., Thompson, S., Souza, D.W., Paul, S., Mulligan, R.C., Smith, A.E. and Welsh, M.J. 1991. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253, 202-205.

Azzaria, M., Schurr, E. and Gros, P. 1989. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5289-5297.

Baas, F. and Borst, P. 1988. The tissue dependent expression of hamster P-glycoprotein genes. *FEBS letters* 229, 329-332.

Baldini, N., Scotlandi, K., Barbanti-Bròdano, G., Manara, M.C., Maurici, D., Bacci, G., Bertoni, F., Picci, P., Sottili, S., Campanacci, M. and Serra, M. 1995. Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *New Engl. J. Med.* 333, 1380-1385.

Bates, S.E., Lee, J.S., Dickstein, B., Spolyar, M. and Fojo, A.T. 1993. Differential modulation of P-glycoprotein transport by protein kinase inhibition. *Biochemistry* 32, 9156-9164.

Batist, G., Tulpule, A., Sinha, B.K., Katki, A.G., Myers, C.E. and Cowan, K.H. 1986. Overexpression of a novel glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 261, 15544-15549.

Bear, C.E., Li, C., Kartner, N., Bridges, R.J., Jensen, T.J., Ramjeesingh, M. and Riordan, J.R. 1992. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* 68, 809-818.

- Beaulieu, E., Demeule, M., Pouliot, J.-F., Averill-Bates, D.A., Murphy, G.F. and Béliveau, R. 1995. P-glycoprotein of blood brain barrier: cross-reactivity of MAb C219 with a 190 kDa protein in bovine and rat isolated brain capillaries. *Biochim. Biophys. Acta* 1233, 27-32.
- Beck, W.T. and Cirtain, M.C. 1982. Continued expression of vinca alkaloid resistance by CCRF-CEM cells after treatment with tunicamycin or pronase. *Cancer Res.* 42, 184-189.
- Beckett, G.J. and Hayes J.D. 1993. Glutathione S-transferase: biomedical applications. 1993. *Adv. Clin. Chem.* 30, 281-379.
- Betz, A.L. and Goldstein, G.W. 1978. Polarity of the blood-brain barrier: Neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science* 202, 225-226.
- Betz, A.L., Firth, J.A. and Goldstein, G.W. 1980. Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of the brain capillary endothelial cells. *Brain Res.*192, 17-28.
- Biedler, J.L. and Rheim, H. 1970. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30, 1174-1184.
- Billson, A. L., Palmer, J. B., Walker, D. A. and Lowe, J. 1994. Multidrug resistance gene (MDR 1) expression in neuro-axial tumours of children and young adults. *Br. J. Neurosurg.* 8, 585-591.
- Board, P.G., Suzuki, T. and Shaw, D.C. 1988. Human muscle glutathione S-transferase (GST-4) shows close homology to human liver GST-1. *Biochim. Biophys. Acta* 953, 214-217.
- Boesch, D. and Loor, F. 1994. Extent and persistence of P-glycoprotein inhibition in multidrug resistant P388 cells after exposure to resistance-modifying agents. *Anti-Cancer Drugs* 5, 229-238.
- Boote, D.J., Dennis, I.F., Twentyman, P.R., Osborne, R.J., Laburte, C., Hensel, S., Smyth, J.F., Brampton, M.H. and Bleehen, N.M. 1996. Phase I study of etoposide with SDZ PSC 833 as a modulator of multidrug resistance in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* 14, 610-618.
- Bordow, S.B., Haber, M., Madafiglio, J., Cheung, B., Marshall, G.M. and Norris, M. 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, 5036-5040.
- Bradley, G., Georges, E. and Ling, V. 1990. Sex-dependent and independent expression of the P-glycoprotein isoforms in chinese hamster. *J. Cell. Physiol.* 145, 398-408.
- Breuer, W., Slotki, I.N., Ausiello, D.A. and Cabantchik, I.Z. 1993. Induction of multidrug resistance downregulates the expression of CFTR in colon epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 265, C1711-1715.
- Brightman, M.W. 1989. Implications of the blood-brain barrier and its manipulation, *Basic science aspects* 1, 53-83.

- Brightman, M.W. and Tao-Cheng, J.H. 1993. Tight junctions of brain endothelium and epithelium, dans *The blood-brain barrier: cellular and molecular biology*, New-York Raven Press, Éd. W.M. Pardridge, 107-125.
- Buschman, E., Arceci, R.J., Croop, J.M., Che, M., Arias, I.M., Housman, D.E. and Gros, P. 1992. *mdr2* encodes P-glycoprotein expressed in the bile canalicular membrane as determined by isoform-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 267, 18093-18099.
- Cancilla, P.A., Bready, J. and Berliner, J. 1993. Brain endothelial-astrocyte interaction, dans *The blood-brain barrier: cellular and molecular biology*, New-York Raven Press, Éd. W.M. Pardridge, 25-46.
- Center, M.S. 1983. Evidence that adriamycin resistance in Chinese hamster lung cells is regulated by phosphorylation of a plasma membrane glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 115, 159-166.
- Chambers, T.C., Chalikonda, I. and Eilon, G. 1990. Correlation of protein kinase C translocation, P-glycoprotein phosphorylation and reduced drug accumulation in multidrug resistant human KB cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 169, 253-259.
- Chambers, T.C., Zheng, B. and Kuo, J.F. 1992. Regulation by phorbol ester and protein kinase-C inhibitors, and by a protein phosphatase inhibitor (okadaic acid) of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug-resistant human KB cells. *Mol. Pharmacol.* 41, 1008-1015.
- Chambers, T.C., Pohl, J., Raynor, R.R. and Kuo, J.F. 1993. Identification of specific sites in human P-glycoprotein phosphorylated by protein kinase-C. *J. Biol. Chem.* 268, 4592-4595.
- Chambers, T.C., Pohl, J., Glass, D.B. and Kuo, J.F. 1994. Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein. *Biochem. J.* 229, 309-315.
- Chambers, T.C., Germann, U.A., Gottesman, M.M., Pastan, I., Kuo, J.F. and Ambudkar, S.V. 1995. Bacterial expression of the linker region of human *MDR1* P-glycoprotein and mutational analysis of phosphorylation sites. *Biochemistry* 34, 14156-14162.
- Chan H.S.L., Bradley G., Thorner P., Haddad G., Gallie B.L. and Ling V. 1988. A sensitive method for immunocytochemical detection of Pgp in multidrug-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Laboratory investigation* 59 (6) 870-875.
- Chan, H.S.L., DeBoer, G., Thorner, P.S., Haddad, G., Gallie, B.L. and Ling, V. 1994. Multidrug resistance: Clinical opportunities in diagnosis and circumvention. *Hematology-oncology clinics of North America* 8, 383-410.
- Chan, H.S.L., DeBoer, G., Haddad, G., Gallie, B.L. and Ling, V. 1995a. Multidrug resistance in pediatric malignancies. *Hematology-oncology clinics of North America* 9, 275-318.
- Chan, H.S.L., DeBoer, G., Haddad, G. and Ling, V. 1995b. Multidrug resistance in pediatric sarcomas. *Hematology-oncology clinics of North America* 9, 889-908.

- Chaudhary, P.M. and Roninson, B. 1992. Activation of *MDR1* (P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase-C agonists. *Oncol. Res.* 4, 281-290.
- Chen, C.-J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. and Roninson, I.B. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47, 381-389.
- Chin, K.-V., Pastan, I. and Gottesman, M.M. 1993. Function and regulation of the human multidrug resistance gene. *Adv. Cancer Res.* 60, 157-180.
- Chugani, D.C., Rome, L.H. and Kedersha, N.L. 1993. Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J. Cell Sci.* 106, 23-29.
- Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M. and Deeley, R.G. 1992. Overexpression of a transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650-1654.
- Coomber, B.L. and Stewart, P.A. 1985. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc. Res.* 30, 99-115.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. and Bertino, J.R. 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 695-698.
- Cordon-Cardo, C. 1991. Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression in normal and tumor tissues in humans. In: *Molecular and cellular biology of multidrug resistance in tumor cells*, Plenum Press, New-York and London. Ed. Igor B. Roninson, 303-318.
- Cornwell, M.M., Tsuruo, T., Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1987. ATP-binding properties of P-glycoprotein from multidrug-resistant KB cells. *FASEB J.* 1, 51-54.
- Croop, J.M., Raymond, M., Haber, D., Devault, A., Arceci, R.J., Gros, P. and Housman, D.E. 1989. The three mouse multidrug resistance (*mdr*) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1346-1350.
- Dallaire, L., Tremblay, L. and Béliveau, R. 1991. Purification and characterization of metabolically active capillaries of the blood-brain barrier. *Biochem. J.* 276, 745-752.
- Danø, K. 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 323, 466-483.
- De Angelis, P., Stokke, T., Smedshammer, L., Lothe, R.A., Lehne, G., Chen, Y. and Clausen, O.P.F. 1995. P-glycoprotein is not expressed in a majority of colorectal carcinomas and is not regulated by mutant p53 *in vivo*. 1995. *Br. J. Cancer* 72, 307-311.
- Demeule, M., Wenger, R.M. and Béliveau, R. 1997. Molecular interactions of cyclosporin A with P-glycoprotein. *J. Bio. Chem.* 272, 6647-6652.
- Deuchars, K.L., Duthie, M. and Ling, V. 1992. Identification of distinct P-glycoprotein gene sequences in rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1130, 157-165.

- Devault, A. and Gros, P. 1990. Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1652-1663.
- Devine, S.E., Hussain, A., Davide, J.P. and Melera, P.W. 1991. Full length and alternatively spliced *pgp1* transcripts in multidrug-resistant Chinese hamster lung cells. *J. Biol. Chem.* 266, 4545-4555.
- Didier, A.D. and Loor, F. 1995. Decreased biotolerability for ivermectin and cyclosporin A in mice exposed to potent P-glycoprotein inhibitors. *Int. J. Cancer* 63, 263-267.
- Doige, C.A., Yu, X. and Sharom, F.J. 1992. ATPase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1109, 149-160.
- Doige, C.A., Yu, X. and Sharom, F.J. 1993. The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1146, 65-72.
- Dragsten, P.R., Blumenthal R. and Handler, J.S. 1981. Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* 294, 718-722.
- Drew L., Warr J.R. and Rumsby M.G. 1995. A role for protein kinase C in the multidrug resistance phenotype of human carcinoma KB cell lines. *Biochem. Soc. Tans.* 23, 447S.
- Drion, N., Lemaire, M., Lefauconnier, J.M. and Scherrman, J.M. 1996. Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine. *J. Neurochem.* 67, 1688-1693.
- Esteller, M., Martinez-Palones, J.M., Garcia, A., Xercavins, J. and Reventos, J. 1995. High rate of *MDR-1* and heterogenous patterns of *MRP* expression without gene amplification in endometrial cancer. *Int. J. Cancer* 63, 798-803.
- Fardel, O., Loyer, P., Lecureur, V., Glaise, D. and Guillouzo, A. 1994. Constitutive expression of functional P-glycoprotein in rat hepatoma cells. *Eur. J. Biochem.* 219, 521-528.
- Fine, R.L., Patel, J. and Chabner, B.A. 1988. Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 582-586.
- Flens, M.J., Zaman, G.J.R., van der Valk, P., Izquierdo, M.A., Schroeijers, A.B., Scheffer, G.L., van der Groep, P., de Haas, M., Meijer, C.J.L.M. and Scheper, R.J. 1996. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am. J. Pathol.* 148, 1237-1247.
- Flynn, S.D., Murren, J.R., Kirby, W.M., Honig, J., Kan, L. and Kinder, B.K. 1992. P-glycoprotein expression and multidrug resistance in adrenocortical carcinoma. *Surgery* 112, 981-986.
- Fojo, A., Lebo, R., Shimizu, N., Chin, J.E., Roninson, I.B., Merlino, G.T., Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1986. Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. *Somatic Cell Mol. Genet.* 12, 415-420.

- Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1987. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 265-269.
- Galiotta, L.J.V., Romeo, G. and Zegarra-Moran, O. 1996. Volume regulatory taurine release in human tracheal 9HTEo<sup>-</sup> and multidrug resistant 9HTEo<sup>-</sup>/Dx cells. *Am. J. Physiol.* 271, C728-C735.
- Georges, E., Bradley, G., Garipey, J. and Ling, V. 1990a. Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 152-156.
- Georges, E., Sharom, F.J. and Ling, V. 1990b. Multidrug Resistance and Chemosensitization: Therapeutic Implications for Cancer Chemotherapy. *Adv. Pharmacol.* 21, 185-220.
- Georges E., Zhang J.T. and Ling V. 1991. Modulation of ATP and drug binding by monoclonal antibodies against P-glycoprotein. *J. Cell. Physiol.* 148, 479-484.
- Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K. and Ling, V. 1986. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324, 485-489.
- Germann, U.A., Chambers, T.C., Ambudkar, S.V., Pastan, I. and Gottesman, M.M. 1995. Effects of phosphorylation of P-glycoprotein on multidrug resistance. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 53-61.
- Germann, U.A., Chambers, T.C., Ambudkar, S.V., Licht, T., Cardarelli, C.O., Pastan, I. and Gottesman, M.M. 1996. Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271, 1708-1716.
- Gill, D.R., Hyde, S.C., Higgins, C.F., Valverde, M.A., Mintenig, G.M. And Sepulveda, F. 1992. Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell* 71,23-32.
- Goasguen, J.E., Dossot, J.M., Fardel, O., Le Mee, F., Le Gall, E., Leblay, R., LePrise, P.Y., Chaperon, J. and Fauchet, R. 1993. Expression of the multidrug resistance associated P-glycoprotein (P-170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Blood* 82, 3505-3507.
- Goldstein, G.W. and Betz, A.L. 1986. The blood-brain barrier. *Sci. Am.* 254, 74-83.
- Gottesman, M. M. and Pastan, I. 1988. The multidrug transporter, a double-edge sword. *J. Biol. Chem.* 263, 12163-12166.
- Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.
- Gottesman, M. M., Hrycyna, C.A., Schoenlein, P.V., Germann, U.A. and Pastan, I. 1995. Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Genet.* 29, 607-649.

- Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Cole, S.P.C. and Deeley, R.G. 1994. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* 54, 357-361.
- Greenberger, L. M., Williams, S. S., Georges, E., Ling, V. and Horwitz, S.B. 1988. Electrophoretic analysis of P-glycoproteins produced by mouse J774.2 and chinese hamster ovary multidrug-resistant cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 506-510.
- Greenberger, L.M., Croop, J.M., Horwitz, S.B. and Arceci, R.J. 1989. P-glycoprotein encoded by *mdr 1b* in murine gravid uterus and multidrug resistant tumor cell lines are differentially glycosylated. *FEBS Letters* 257, 419-421.
- Gros, P., Croop, J., Roninson, I. Varshavsky, A. and Housman, D.E. 1986a. Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 337-341.
- Gros, P., Croop, J. and Housman, D.E. 1986b. Mammalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47, 371-380.
- Gros, P., Raymond, M., Bell, J. and Housman, D.E. 1988. Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2770-2778.
- Hamada, H., Hagiwara, K.-I., Nakajima, T. and Tsuruo, T. 1987. Phosphorylation of the Mr 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: effects of verapamil, trifluoperazine, and phorbol esters. *Cancer Res.* 47, 2860-2865.
- Hamada, H. and Tsuruo, T. 1988a. Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. *J. Biol. Chem.* 263, 1454-1458.
- Hamada, H. and Tsuruo, T. 1988b. Characterization of the ATPase activity of the  $M_r$  170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res.* 48, 4926-4932.
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S.-I., Harada, S.-I., Yamashita, J. and Yamamoto, H. 1997. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19, 13-26.
- Hegewisch-Becker S. 1996. MDR1 reversal: criteria for clinical trials designated to overcome the multidrug resistance phenotype. *Leukemia* 10, S32-S38.
- Hegmann, E.J., Bauer, H.C. and Kerbel, R.S. 1992. Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral endothelial cells. *Cancer Res.* 52, 6969-6975.
- Hellman, S. and Vokes, E.E. 1996. Advancing current treatments for cancer. *Sci. Am.* September 118-123.
- Henson, J.W., Cordon-Cardo, C. and Posner, J. B. 1992. P-glycoprotein expression in brain tumors. *J. Neuro-Oncol.* 14, 37-43.
- Hijazi, Y.M., Axiotis, C.A., Navarro, S., Steinberg, S.M., Horowitz, M.E. and Tsokos, M. 1994. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in Ewing's sarcoma and



peripheral primitive neuroectodermal tumors before and after chemotherapy. *Am. J. Clin. Pathol.* 102, 61-67.

Horio, M., Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1988. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3580-3584.

Ichikawa, M., Yoshimura, A., Furukawa, T., Sumizawa, T., Nakazima, Y., and Akiyama, S.-I. 1991. Glycosylation of P-glycoprotein in a multidrug-resistant KB cell line, and in human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1073, 309-315.

Izquierdo, M.A., van der Zee, A., Vermoken, J.B., van der Valk, P., Belien, J.A.M., Giaccone, G., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Pinedo H.M., Kenemans, P., Meijer, C.J.L.M., de Vries, E.G.E. and Scheper, R.J. 1995. Drug resistance-associated marker LRP for prediction of response to chemotherapy and prognosis in advanced ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 1230-1237

Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Giaccone, G., Broxterman, H.J., Meijer, C.J.L.M., van der Valk, P. and Scheper, R.J. 1996a. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am. J. Pathol.* 148, 877-887.

Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Schroeijers, A.B., van der Valk, P. and Scheper, R.J. 1996b. Major vault protein LRP-related multidrug resistance. *Eur. J. Cancer* 32A, 979-984.

Izquierdo, M.A., Shoemaker, R.H., Flens, M.J., Scheffer, G.L., Wu, L., Prather, T.R. and Scheper, R.J. 1996c. Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer-cell lines. *Int. J. Cancer* 65, 230-237.

Jacobson, B.S., Schnitzer, J.E., McCaffery, M. and Palade, G. 1992. Isolation and partial characterization of the luminal plasmalemma of microvascular endothelium from rat lungs. *Eur. J. Cell Biol.* 58, 296-306.

Janzer, R.C. and Raff, M.C. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253-257.

Jetté, L., Têtu, B. and Béliveau, R. 1993. High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries. *Biochim. Biophys. Acta* 1150, 147-154.

Jetté, L., Pouliot, J.-F., Murphy, G.F. and Béliveau, R. 1995a. Isoform I (mdr3) is the major form of P-glycoprotein expressed in mouse brain capillaries. *Biochem. J.* 305, 761-766.

Jetté, L., Murphy, G.F., Leclerc, J.-M. and Béliveau, R. 1995b. Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1701-1709.

Juliano, R.L. and Ling, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152-162.

Kainulainen, H., Breiner, M., Schürman, A., Marttinen, A., Virjo, A. and Joost, H.G. 1994. In vivo glucose uptake and glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT4 in

- heart and various types of skeletal muscle from streptozotocin-diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1225, 275-282.
- Kang, Y.K., Zhang, Z., Regis, J., Robey, R., Meadows, B., Dickstein, B., Lee, J.S., Otsuki, T., Stetler-Stevenson, M., Jaffe, E.S., Solomon, D., Wilson, W.H., Fojo, A. and Bates, S.E. 1995. Expression of *mdr-1* in refractory lymphoma: quantitation by polymerase chain reaction and validation of the assay. *Blood* 68, 1515-1524.
- Kaplan, J.H. 1993. Molecular biology of carrier proteins. *Cell* 72, 13-18.
- Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G. and Ling, V. 1985. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 316, 820-823.
- Kawai, K., Kusano, I., Ido, M., Sakurai, M., Shiraishi, T. and Yatani, R. 1994. Identification of a P-glycoprotein-related protein (mini-P-glycoprotein) which is overexpressed in multidrug resistant cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 198, 804-810.
- Kennelly, P.J. and Krebs, E.G. 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 266, 15555-15558.
- Klimecki, W.T., Futscher, B.W., Grogan, T.M. and Dalton, W.S. 1994. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 83, 2451-2458.
- Kramer, R., Weber, T.K., Arceci, R., Ramchurren, N., Kastriakis, W.V., Steele, G. Jr and Summerhayes, I.C. 1995. Inhibition of *N*-linked glycosylation of P-glycoprotein by tunicamycin results in a reduced multidrug resistance phenotype. *Br. J. Cancer* 71, 670-675.
- Krishnamachary, N. and Center, M.S. 1993. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res.* 53, 3658-3661.
- Kuchler, K., Sterne, J.E. and Thorner, J. 1989. *Saccharomyces cerevisiae* *STE6* gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.* 8, 3973-3984.
- Kuchler, K. and Thorner, J. 1992. Secretion of peptides and proteins lacking hydrophobic signal sequences: The role of adenosine triphosphate-driven membrane translocators. *Endocrine Rev.* 13, 499-514.
- Kuwazuru, Y., Yoshimura, A., Hanada, S., Utsunomiya, A., Makino, T., Ishibashi, K., Kodama, M., Iwahashi, M., Arima, T. and Akiyama, S.-I. 1990. Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in acute leukemia cells and correlation to clinical drug resistance. *Cancer* 66, 868-873.
- Lehne, G., De Angelis, P., Clausen, O.P.F., Egeland, T., Tsuruo, T. and Rugstad, H.E. 1995. Binding diversity of antibodies against external and internal epitopes of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Cytometry* 20, 228-237.

- Lelong, I.H., Cardarelli, C.O., Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1994. GTP-stimulated phosphorylation of P-glycoprotein in transporting vesicles from KB-V1 multidrug resistant cells. *Biochemistry* 33, 8921-8929.
- Lidinsky, W.A. and Drewes, L.R. 1983. Characterization of the blood-brain barrier: protein composition of the capillary endothelial cell membrane. *J. Neurochem.* 41, 1341-1348.
- Liotta, L. 1995. La formation des métastases cancéreuses. *Pour la Science*, dossier hors série, octobre 74-79.
- 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. and Dalton, W.S. 1996. Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 87, 2464-2469.
- Loe, D.W., Almquist, K.C., Cole, S.P.C. and Deeley, R.G. 1996a. ATP-dependent  $17\beta$ -estradiol 17-( $\beta$ -D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). *J. Biol. Chem.* 271, 9683-9689.
- Loe, D.W., Almquist, K.C., Deeley, R.G. and Cole, S.P.C. 1996b. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane. *J. Biol. Chem.* 271, 9675-9682.
- Loo, T.W. and Clarke, D. 1994. Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J. Biol. Chem.* 269, 7750-7755.
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. 1995a. Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 270, 22957-22961.
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. 1995b. Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 270, 843-848.
- Lyubimov, E., Lan, L.-B., Pashinski, I. and Stein, W.D. 1996. Effect of modulators of the multidrug resistance pump on the distribution of vinblastine in tissues of the mouse. *Anti-cancer drugs* 7, 60-69.
- Ma, L., Marquard, D., Takemoto, L. and Center, M.S. 1991. Analysis of P-glycoprotein phosphorylation in HL60 cells isolated for resistance to vincristine. *J. Biol. Chem.* 266, 5593-5599.
- Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Dillio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R., Pickett, C.B., Sato, K., Widersten, M. and Wolf, C.R. 1992. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 282, 305-306.
- Martinsson, T. and Levan, G. 1987. Localization of the multidrug resistance-associated 170 kDa P-glycoprotein gene to mouse chromosome 5 and to homogeneously staining regions in multidrug-resistant mouse cells by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 45, 99-101.

- McGrath, J.P. and Varshavsky, A. 1989. The yeast *STE6* gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* 340, 400-404.
- Miller, T.P., Grogan, T.M., Dalton, W.S., Spier, C.M., Scheper, R.J. and Salmon, S.E. 1991. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J. Clin. Oncol.* 9, 17-24.
- Miyamoto, K.I., Wakusawa, S., Inoko, K., Takagi, K. and Koyama, M. 1992. Reversal of vinblastine resistance by a new staurosporine derivative, NA-382, in P388/ADR cells. *Cancer Lett.* 64, 177-183.
- Morin, X. K., Bond, T. D., Loo, T. W., Clarke, D. M. and Bear, C. E. 1995. Failure of P-glycoprotein (MDR1) expressed in *Xenopus* oocytes to produce swelling-activated chloride channel activity. *J. Physiol.* 486, 707-714.
- Mousseau, M., Chauvin, C., Nissou, M.-F., Chaffanet, M., Plantaz, D., Pasquier, B., Schaerer, R. and Benabid, A. 1993. A study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumors. *Eur. J. Cancer* 29A, 753-759.
- Müller, M., Meijer, C., Zaman, G.J.R., Borst, P., Scheper, R.J., Mulder, N.H., de Vries, E.G.E. and Jansen, P.L.M. 1994. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 13033-13037.
- Nabors, M.W., Griffin, C.A., Zehnbauser, B.A., Hruban, R.H., Phillips, P.C., Grossman, S.A., Brem, H. and Colvin, O.M. 1991. Multidrug resistance gene (MDR1) expression in human brain tumors. *J. Neurosurg.* 75, 941-946.
- Naito, M., Hamada, H. and Tsuruo, T. 1988. ATP/Mg<sup>2+</sup>-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells. *J. Biol. Chem.* 263, 11887-11891.
- Nishi, K., Yoshida, M., Nishimura, M., Nishikawa, M., Nishiyama, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. 1992. A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoprotein. *Mol. Microbiol.* 6, 761-769.
- Ohnishi, T., Tamai, I., Sakanaka, K., Sakata, A., Yamashima, T., Yamashita, J. and Tsuji, A. 1995. *In vivo* and *in vitro* evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier. *Biochem. Pharmacol.* 49, 1541-1544.
- Orr, G.A., Han, E.K.-H., Browne, P.C., Nieves, E., O'Connor, B.M., Yang, C.-P.H. and Horwitz, S.B. 1993. Identification of the major phosphorylation domain of murine *mdr1b* P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 25054-25062.
- Oude Elferink R.P.J., Ottenhoff R., van Wijland M., Frijters C.M.G., van Nieuwkerk C. and Groen A.K. 1996. Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of *mdr2* P-glycoprotein. *J. Lip. Res.* 37, 1065-1075.
- Pardridge, W.M. 1986. Receptor mediated peptide transport through the blood-brain barrier. *Endocr. Rev.* 7, 314-330.

- Pardridge, W.M., Boado, R.J. and Farrel, C.R. 1990. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* 265, 180354-18040.
- Pastan, I. and Gottesman, M. M. 1991. Multidrug resistance. *Annu. Rev. Med.* 42, 277-286.
- Pavelic, Z.P., Reising, J., Pavelic, L., Kelley, D.J., Stambrook, P.J. and Gluckman, J.L. 1993. Detection of P-glycoprotein with four monoclonal antibodies in normal and tumor tissues. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 119, 753-757.
- Pileri, S.A., Sabattini, E.S., Falini, B., Tazzari, P.L., Gherlinzoni, F., Michieli, M.G., Damiani, D., Zucchini, L., Gobbi, M., Tsuruo, T. and Baccarani, M. 1991. Immunohistochemical detection of the multidrug transport protein p170 in human normal tissues and malignant lymphomas. *Histopathology* 19, 131-140.
- Qian, X.D. and Beck, W.T. 1990. Progesterone photoaffinity labels P-glycoprotein in multidrug-resistant human leukemic lymphoblasts. *J. Biol. Chem.* 265, 18753-18756.
- Ramani, P. and Dewchand, H. 1995. Expression of *mdr1*/P-glycoprotein and p110 in neuroblastomas. *J. Pathol.* 175, 13-22.
- Rao, V.V., Anthony, D.C. and Piwnica-Worms, D. 1994. *MDR1* Gene-specific monoclonal antibody C494 cross-reacts with pyruvate carboxylase. *Cancer. Res.* 54, 1536-1541.
- Rao, V.V., Anthony, D.C. and Piwnica-Worms, D. 1995. Multidrug resistance P-glycoprotein monoclonal antibody JSB-1 crossreacts with pyruvate carboxylase. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 1187-1192.
- Raymond, M., Rose, E., Housman, D.E. and Gros, P. 1990. Physical mapping, amplification, and overexpression of the mouse *mdr* gene family in multidrug resistant cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1642-1651.
- Raymond, M., Gros, P., Whiteway, M. and Thomas, D.Y. 1992. Functional complementation of yeast *ste6* by a mammalian multidrug resistance *mdr* gene. *Science* 256, 232-234.
- Reese, T.S. and Karnovsky, M.J. 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207-217.
- Rennie, J. and Rusting R. 1996. Making headway against cancer. *Sci. Am.* September 56-59.
- Richert, N.D., Aldwin, L., Nitecki, D., Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1988. Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells. *Biochemistry* 27, 7607-7613.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, M., Grzelezak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S. and Tsui, L.-C. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.

- Roninson, I.B., Chin, J.E., Choi, K., Gros, P., Housman, D.E., Fojo, A., Shen, D.-W., Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1986. Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4538-4542.
- Rout, M.P. and Wente, S.R. 1994. Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol.* 4, 357-365.
- Ruetz, S. and Gros, P. 1994. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell* 77, 1071-1081.
- Ruetz, S., Delling, U., Brault, M., Schurr, E. and Gros, P. 1996. The *pfmdr1* gene of *plasmodium falciparum* confers cellular resistance to antimalarial drugs in yeast cells. *Proc. natl. sci. USA* 93, 9942-9947.
- Santalucia, T., Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Nuel, A., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A. 1992. Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle and brown adipose tissue. *Endocrinology* 130, 837-846.
- Sarkadi, B., Müller, M., Homolya, L., Hollo, Z., Seprodi, J., Germann, U.A., Gottesman, M.M., Price, E.M. and Boucher, R.C. 1994. Interaction of bioactive hydrophobic peptides with the human multidrug transporter. *FASEB J.* 8, 766-770.
- Scheper, R.J., Bulte, J.W., Brakkee, J.G., Quak, J.J., van der Schoot, E., Balm, A.J., Meijer, C.J., Broxterman, H.J., Kuiper, C.M., Lankelma, J. and Pinedo, J. 1988. Monoclonal antibody JSB-1 detects a highly conserved epitope on the P-glycoprotein associated with multi-drug-resistance. *Int. J. Cancer.* 42, 389-94.
- Schinkel, A.H., Kemp, S., Dollé, M., Rudenko, G. and Wagenaar, E. 1993. N-Glycosylation and deletion mutants of the human *MDR1* P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 7474-7481.
- Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P.J., Berns, A.J.M. and Borst, P. 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491-502.
- Schinkel, A.H., Mol, C.A.A.M., Wagenaar, E., van Deemter, L., Smit, J.J. and Borst, P. 1995a. Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *Eur. J. Cancer* 31A, 1295-1298.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A.A.M. and Borst, P. 1995b. Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J. Clin. Invest.* 96, 1698-1705.
- Schneider, E., Cowan, K.H., Bader, H., Toomey, S., Schwartz, G.N., Karp, J.E., Burke, P.J. and Kaufmann, S.H. 1995. Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed acute leukemia. *Blood* 85, 186-193.

- Senior, A.E., Al-Shawi, M.K. and Urbatsch, I.L. 1995. ATP Hydrolysis by multidrug-resistance protein from Chinese hamster ovary cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 31-36.
- Serra, M., Scotlandi, K., Manara, M.C., Maurici, D., Benini, S., Sarti, M., Campanacci, M. and Baldini, N. 1995. Analysis of P-glycoprotein expression in osteosarcoma. *Eur. J. Cancer* 31A, 1998-2002.
- Shapiro, A.B. and Ling, V. 1994. ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 269, 3745-3754.
- Sharma, R.C., Inoue, S., Roitelman, J., Schimke, R.T. and Simoni, R.D. 1992. Peptide transport by the multidrug resistance pump. *J. Biol. Chem.* 267, 5731-5734.
- Sharom, F.J., Yu, X. and Doige, C.A. 1993. Functional reconstitution of drug transport and ATPase activity in proteoliposomes containing partially purified P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 24197-24202.
- Sharom, F.J. 1995. Characterization and functional reconstitution of the multidrug transporter. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 15-22.
- Sharom, F.J., Yu, X., Chu, J.W.K. and Doige, C.A. 1995. Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* 308, 381-390.
- Sharom, F.J., Yu, X., Didiato, G. and Chu, J.W.K. 1996. Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport. *Biochem. J.* 320, 421-428.
- Sheng, Z., Vanderpuye, O.A., Hull, S.R., Carraway, C.A. and Carraway, K.L. 1989. Topography and microfilament core association of a cell surface glycoprotein of ascites tumor cell microvilli. *J. Cell. Biochem.* 40, 453-466.
- Shirai, A., Naito, M., Tatsuta, T., Dong, J., Hanaoka, K., Mikami, K., Oh-hara, T., Tsuruo, T. 1994. Transport of cyclosporin A across the brain capillary endothelial cell monolayer by P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1222, 400-404.
- Smit, J.J.M., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P.J., Groen, A.K., Wagenaar, E. van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., Ottenhof, R., van der Lugt, N.M., van Roon, M. van der Valk, M.A., Offerhaus, G.J., Berns, A.J. and Borst, P. 1993. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75, 451-462.
- Smit, J.J.M., Schinkel, A.H., Mol, C.A.A.M., Majoor, D., Mooi, W.J., Jongsma, A.P.M., Lincke, C.R. and Borst, P. 1994. Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab. Invest.* 71, 638-649.
- Stewart, P.A. and Wiley, M.J. 1981. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* 84, 183-192.
- Sugawara, I., Kataoka, L., Morishita, Y., Hamada, H., Tsuruo, T., Hoyama, S. and Mori, S. 1988a. Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK16. *Cancer Res.* 48, 1926-1929.

- Sugawara, I., Nakahama, M., Hamada, H., Tsuruo, T. and Mori, S. 1988b. Apparent stronger expression in the human adrenal cortex than in the human adrenal medulla of Mr 170,000-180,000 P-glycoprotein. *Cancer Res.* 48, 4611-4614.
- Sugawara I. 1990. Expression and function of P-glycoprotein (*mdr1* gene product) in normal and malignant tissues. *Acta Pathol. Jpn.* 40, 545-553.
- Sugawara, I., Hamada, H., Tsuruo, T. and Mori, S. 1990. Specialized localization of P-glycoprotein recognized by MRK16 monoclonal antibody in endothelial cells of the brain and the spinal cord. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 727-730.
- Sundberg, A.G.M., Nilsson, R., Appelkvist, E.-L. and Dallner, G. 1993. Immunohistochemical localization of  $\alpha$  and  $\pi$  class glutathione transferases in normal human tissues. *Pharmacol. Toxicol.* 72, 321-331
- Suzuki, T., Coggan, M., Shaw, D.C. and Board, P.G. 1987. Electrophoretic and immunological analysis of human glutathione S-transferase isoenzymes. *Ann. Hum. Genet.* 51, 95-106.
- Tanaka, Y., Abe, Y., Tsugu, A., Takamiya, Y., Akatsuka, A., Tsuruo, T., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Sato, O., Tamaoki, N. and Nakamura, M. 1994. Ultrastructural localization of P-glycoprotein on capillary endothelial cells in human gliomas. *Virchows Archiv* 452, 133-138.
- Tatsuta, T., Naito, M., Oh-hara, T., Sugawara, I. and Tsuruo, T. 1992. Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* 267, 20383-20391.
- Tatsuta, T., Naito, M., Mikami, K. and Tsuruo, T. 1994. Enhanced expression by the brain matrix of P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells. *Cell Growth and differentiation* 5, 1145-1152.
- Teeter, L.D., Hsu, H.-C., Curley, S.A., Tong, M.J. and Kuo, M.T. 1993. Expression of multidrug resistance (P-glycoprotein) *MDR1* and *MDR2* genes in human hepatocellular carcinomas and liver metastases of colonic tumors. *Int. J. Oncol.* 2, 73-80.
- Tew, K.D. 1994. Glutathione associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 54, 4313-4320.
- Thévenod, F., Anderie, I. and Schulz, I. 1994. Monoclonal antibodies against MDR1 P-glycoprotein inhibit chloride conductance and label a 65-kDa protein in pancreatic zymogen granule membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 24410-24417.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M. and Pastan, I. 1987. Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7735-7738.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. and Willingham, M.C. 1989. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein p170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 159-164.



- Tominaga, M., Tominaga, T., Miwa, A. and Okada, Y. 1995. Volume sensitive chloride channel activity does not depend on endogenous P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 270, 27887-27893.
- Tóth K., Vaughan M.M., Slocum H.K., Arredondo, M.A., Takita H., Baker R.M. and Rustum Y.M. 1994. New immunohistochemical "sandwich" staining method for *mdr1* P-glycoprotein detection with JSB-1 monoclonal antibody in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues. *Am. J. Pathol.* 144, 227-236.
- Tóth, K., Vaughan, M.M., Peress, N.S., Slocum, H.K., and Rustum, Y.M. 1996. *MDR1* P-glycoprotein is expressed by endothelial cells of newly formed capillaries in human gliomas but is not expressed in the neovasculature of other primary tumors. *Am. J. Pathol.* 149, 853-858.
- Treize, A.E.O., Romano, P.R., Gill, D.R., Hyde, S.C., Sepulveda, F.V., Buchwald, M. and Higgins C.F. 1992. The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression. *EMBO J.* 11, 4291-4303.
- Tsuji, A., Terasaki, T., Takabatake, Y., Tenda, Y., Tamai, I., Yamashita, T., Moritani, S., Tsuruo, T. and Yamashita, J. 1992. P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Life Sci.* 51, 1427-1437.
- Tsuji, A., Tamai, I., Sakata, A., Tenda, Y. and Terasaki, T. 1993. Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 46, 1096-1099.
- Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Komano, T. and Hori, R. 1992. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone and dexamethasone, but not progesterone. *J. Biol. Chem.* 267, 24248-24252.
- Urbatsch, I.L., Al-Shawi, M.K. and Senior, A.E. 1994. Characterization of the ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Biochemistry* 33, 7069-7076.
- Urbatsch, I. L., Sankaran, B., Bhagat, S. and Senior, A. E. 1995. Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active. *J. Biol. Chem.* 270, 26956-26961.
- Valverde, M.A., Diaz, M., Sepúlveda, F.V., Gill, D.R., Hyde, S.C. and Higgins, C.F. 1992. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355, 830-833.
- Valverde, M.A., Bond, T.D., Hardy, S. P., Taylor, J.C., Higgins, C.F., Altamirano, J. and Alvarez-Leefmans, F.J. 1996. The multidrug resistance P-glycoprotein modulates cell regulatory volume decrease. *EMBO J.* 15, 4460-4468.
- van Asperen, J., Schinkel, A.H., Beijnen, J.H., Nooijen, W.J., Borst, P. and van Tellingen, O. 1996. Altered pharmacokinetics of vinblastine in *Mdr1a* P-glycoprotein-deficient mice. *J. Natl Cancer Inst.* 88, 994-999.
- van der Blik, A.M., Kooiman, P.M., Schneider, C. and Borst, P. 1988. Sequence of *mdr3* cDNA encoding a human P-glycoprotein. *Gene* 71, 401-441.
- van der Valk, P., van Kalken, C.K., Ketelaars, H., Broxterman, H.J., Scheffer, G., Kuiper, C.M., Tsuruo, T., Lankelma, J., Meijer, C.J.L.M., Pinedo, H.M. and Scheper,

- R.J. 1990. Distribution of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. *Ann. Oncol.* 1, 56-64.
- van Helvoort, A., Smit, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P. and van Meer, G. 1996. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87, 507-517.
- van Veen, H.W., Venema, K., Bolhuis, H., Oussenko, I., Kok, J., Poolman, B., Driessen, A.J.M. and Konings, W.N. 1996. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10668-10672.
- Vorbrodt, A.W. 1988. Ultrastructural cytochemistry of blood-brain barrier endothelia. *Prog. Histochem. Cytochem.* 18 (3), 1-96.
- Wakusawa, S., Inoko, K., Miyamoto, K., Kajita, S., Hasegawa, T., Harimaya, K. and Koyama, M. 1993. Staurosporine derivatives reverse multidrug resistance without correlation with their protein kinase inhibitory activities. *J. Antibiot.* 46, 353-355.
- Wang, Q., Yang, H., Miller, D.W. and Elmquist, W. 1995. Effect of the P-glycoprotein inhibitor, cyclosporin A, on the distribution of rhodamine-123 to the brain: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 211, 719-726.
- Weinberg, R.A. 1996. How cancer arises. *Sci. Am.* September 62-70.
- Yoshimura, A., Kuwazuru, Y., Sumizawa, T., Ikeda, S.-I., Ichikawa, M., Usagawa, T. and Akiyama, S.-I. 1989. Biosynthesis, processing and half-life of P-glycoprotein in a human multidrug-resistant KB cell. *Biochim. Biophys. Acta* 992, 307-314.
- Zhang, L., Sachs, C.W., Fine, R.L. and Casey, P.J. 1994. Interaction of prenylcysteine methyl esters with the multidrug resistance transporter. *J. Biol. Chem.* 269, 15973-15976.
-

## CHAPITRE VI

### ANNEXES

#### 6.1 Contribution des coauteurs

Dr. Richard Béliveau est mon directeur de recherche et c'est grâce à lui que j'ai pu réaliser tous mes travaux.

Dr. Michel Demeule est mon plus proche collaborateur et il est également impliqué dans ce projet de recherche sur la P-glycoprotéine. Il a contribué à l'expérimentation et à l'interprétation des résultats contenus dans les trois manuscrits de cette thèse.

Dr. Gérard F. Murphy est celui qui représente Sandoz Canada Inc. (Maintenant Novartis), une compagnie nous subventionnant pour ce projet.

Dr. Diana A. Averill-Bates nous a fourni la lignée cellulaire tumorale CH<sup>R</sup>C5, qui surexprime la P-glycoprotéine et qui a été utilisée comme contrôle dans le premier manuscrit.

Dr. Jean-François Pouliot a contribué au premier manuscrit en effectuant l'expérimentation concernant le partitionnement dans le Triton X-114.

Lucie Jetté a contribué à la préparation de membranes totales de tissus et de capillaires cérébraux de souris utilisés dans le second manuscrit.

Dr. Lucian Ghitescu a fourni les préparations de membranes lumineales de cellules endothéliales utilisées dans le troisième manuscrit.

---

## 6.2 Contribution (de Édith) à des articles non-inclus dans cette thèse

J'ai personnellement collaboré à certaines expériences incluses dans les articles suivants:

Demeule, M., Vachon, V. Delisle, M-C., Beaulieu, E., Averill-Bates, D., Murphy, G.F. and R. Béliveau.  
Molecular Study of P-glycoprotein in Multidrug Resistance Using Surface Plasmon Resonance. *Anal. Biochem.*, 230, 239-247, 1995.

Beaulieu, E., Demeule, M., Averill, D A. and R. Béliveau.  
The Strongest Expression of P-Glycoprotein is in the Blood Brain Barrier in Biology and Physiology of the blood-brain barrier. Plenum Press, Couraud and Scherman Ed. 1996. (Résumé de présentation au Congrès international de CVB'95. Juillet 1995)

Jetté, L., Beaulieu, E., Leclerc, J.-M. and R. Béliveau.  
Cyclosporin A Treatment Induces Overexpression of P-Glycoprotein in the Kidney and Other Tissues. *Am. J. Physiol.* 270, F756-F765, 1996.

Béliveau, R., Demeule, M., Jetté, L. and Beaulieu, E.  
Chemotherapy and Chemosensitization in an Introduction to the Blood-Brain Barrier. Cambridge University Press, W.M. Pardridge Ed. 1997. In press.

Demeule, M., Sepehr-Araé, A., Beaulieu, E., Bélanger, M-F., Averill-Bates, D., Wenger, R.M. and Béliveau, R.  
P-glycoprotein Inhibition by Cyclosporin A Analogs and Metabolites. (Soumis)

Boyer, C.J.C., Baines, A.D., Beaulieu, E. and Béliveau, R.  
Immunodetection and Characterization of GLVR-1, a Ubiquitous Sodium-dependent Phosphate Cotransporter. *Biochim. Biophys. Acta*, in press

## P-glycoprotein of blood brain barrier: cross-reactivity of MAb C219 with a 190 kDa protein in bovine and rat isolated brain capillaries

Edith Beaulieu, Michel Demeule, Jean-François Pouliot, Diana A. Averill-Bates, Gérard F. Murphy<sup>1</sup>, Richard Béliveau<sup>\*</sup>

Laboratoire de Membranologie and Groupe de Recherche en Biothérapeutique Moléculaire, Département de Chimie-Biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale A, Montréal, Qué., H3C 3P8, Canada

Received 31 May 1994; accepted 24 September 1994

### Abstract

P-glycoprotein (P-gp), an active efflux pump of antitumor drugs, is strongly expressed in endothelial cells of the blood brain barrier (BBB). Two proteins (155 and 190 kDa) were detected by Western blot analysis of beef and rat capillaries with the monoclonal antibody (MAb) C219. In order to characterize the nature of these proteins, their profile of solubilization by different detergents was established and compared with that of P-gp from the CH<sup>R</sup>C5 tumoral cell line. The 155 kDa protein (p155) of capillaries and the P-gp of CH<sup>R</sup>C5 cells were well solubilized by deoxycholate and Elugent, whereas the 190 kDa protein (p190) was only solubilized by sodium dodecylsulfate (SDS). Both proteins have different patterns of extraction by Triton X-114, p155 partitioning as a membrane protein, while p190 was insoluble. Deglycosylation of capillary proteins resulted in a 27–28 kDa decrease in the apparent molecular weight of p155, similar to that observed for the P-gp of CH<sup>R</sup>C5 cells, but a decrease of only 7–8 for p190. Only p155 was immunoprecipitated by MAb C219. These results suggest that only p155 is the P-gp in BBB and that MAb C219 cross-reacts with a 190 kDa MDR-unrelated glycosylated protein. Consequently, the use of this antibody, which is frequently used to detect P-gp in tumors, could be a pitfall of immunohistochemistry screening for cancer tissues and lead to false positive in the diagnosis of MDR.

**Keywords:** P-glycoprotein; Glycoprotein; Brain capillary; Membrane; Cancer

### 1. Introduction

Multidrug resistance (MDR) constitutes a major obstacle in the clinical treatment of cancer [1]. The overexpression of a membrane glycoprotein of 150–170 kDa [2–4], P-glycoprotein (P-gp), is considered to be the cause of this resistance to multiple chemotherapeutic drugs [5]. P-gp has been cloned from different species including mouse and hamster [6] which possess three gene classes (I, II and III) and from human who has two classes (I and III) [5,7,8]. A model based on its amino acid sequence suggests that P-gp

is an integral membrane protein with 12 transmembrane domains. Hydrophilic domains include an external glycosylation site and two internal ATP-binding sites [5,9].

The presence of P-gp has been demonstrated in normal tissues such as adrenal medulla, liver, kidney, colon [10,11] and endothelial cells of brain capillaries [11–13] where it is strongly expressed. Brain capillaries have a unique structure and constitute a selective barrier between blood and brain [14–16]. A recent report showed that P-gp has a pharmacological effect in brain, it limits the amount of drug accumulating [17]. Viable mice with a disruption of the *mdr1a* P-glycoprotein gene have been generated. These chimeric mice presented extreme sensitivity to ivermectin, which was associated with high accumulation of ivermectin in the brain. The absence of *mdr1a* P-gp increased the accumulation of vinblastine in the brain, where it was eliminated much more slowly [17].

Among the various antibodies available to detect P-gp in human tumors and in animal studies, MAb C219 is by far the most widely used. MAb C219 recognizes the

Abbreviations: P-gp, P-glycoprotein; BBB, blood brain barrier; MAb, monoclonal antibody; p155, the 155-kDa protein; p190, the 190 kDa protein; MDR, multidrug resistance; PB, physiological buffer; HM, homogenate medium; TBS-T, Tris-buffered saline-Tween 20; PVDF, polyvinylidene difluoride.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: +1 (514) 9874054.

<sup>1</sup> Present address: Sandoz Canada Inc., 385 boul. Bouchard, Dorval, Qué., H9R 4P5, Canada.

epitope VQEALD, which is a conserved carboxy-terminal cytoplasmic sequence. The extensive use of this antibody is justified by its high affinity for the different classes of P-gp isoforms identified so far in most species where it was studied, including human, rat, mouse, beef, hamster and cell lines of various origins [2,18]. However, cross-reactivity of MAb C219 have already been reported with a protein of 65 kDa by Western blot and with a muscular protein by immunohistochemistry [19,20]. In this paper, we present a biochemical characterization of P-gp in purified BBB endothelial cells. A tumoral cell line from chinese hamster ovaries (CH<sup>R</sup>C5) which expresses the MDR phenotype was used as a reference [7,9,21]. Two proteins were immunodetected with MAb C219 in beef and rat brain capillaries. Different physico-chemical treatments were performed to compare these two proteins and determine whether they are related to P-gp. Our results suggest that p155 is P-gp while p190 is MDR-unrelated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Dextran T-70 and protein A sepharose 4 fast flow were purchased from Pharmacia LKB Biotechnology (Montréal, Quebec). Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Mississauga, Ontario). MAb C219 was a product of ID Labs (London, Ontario). Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG and enhanced chemiluminescence reagents were obtained from Amersham (Oakville, Ontario). Endoglycosidase F/N-glycosidase F and Hepes were from Boehringer-Mannheim (Laval, Quebec). Triton X-100, Triton X-114, Triton X-100 and X-114 and Tween 20 were from Bio-Rad and SDS was from Pierce (Rockford, IL). All the other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

### 2.2. Purification of brain capillaries

Fresh bovine brains were obtained from a local abattoir and transported to the laboratory in ice-cold physiological buffer (PB) composed of 147 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose and 15 mM Hepes/Tris, pH 7.4. Beef brain capillaries were then purified with the procedure of Dallaire et al. [22]. Brain capillaries were also isolated from Sprague-Dawley rats. For both species, the pia mater was removed, and the cerebral cortex was homogenized in 5 volumes of PB with polytron (Brinkman Instruments, Rexdale, Ontario). The homogenates were mixed with an equal volume of 26 or 1% (w/v) Dextran T-70 in PB for bovine and rat cortex, respectively. The final pellets were resuspended in PB and stored at -180°C.

### 2.3. Isolation of membranes from CH<sup>R</sup>C5 cells

The CH<sup>R</sup>C5 cells were resuspended in homogenate medium (HM) composed of 50 mM mannitol and 5 mM Hepes/Tris, pH 7.5, homogenized 1 min with a polytron and centrifuged at 30 000 × *g* for 20 min at 4°C. The final pellets were resuspended in MH and stored at -80°C.

### 2.4. Immunodetection of P-gp

P-gp was detected by Western blot analysis using MAb C219. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed with a Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad) according to the method of Laemmli [23]. Brain capillaries or CH<sup>R</sup>C5 membrane preparations were resuspended in sample buffer composed of 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol and 0.00625% bromophenol blue to a final protein concentration of 0.5 mg/ml. The samples were agitated 30 min at 25°C or heated 3 min at 85°C and loaded on 6.25% acrylamide/bisacrylamide (29.1:0.9) gels. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 120 V. Proteins were transferred electrophoretically to a 0.45 μm pore size polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a Millipore Graphite Electrobloater I apparatus (Millipore, Bedford, MA). The transfer buffer contained 96 mM glycine, 10 mM Tris and 10% methanol. The transfer was carried out for 1 h at a constant amperage of 1 mA/cm<sup>2</sup>. Hydrophobic or non-specific sites were blocked overnight at 4°C with 5% powdered skimmed milk in Tris-buffered saline (50 mM Tris and 150 mM NaCl) containing 0.3% Tween 20 (TBS-T). Membranes were washed three times for 15 min in TBS-T. The PVDF membranes were incubated with MAb C219 (200 ng/ml) in TBS-T, 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.05% NaN<sub>3</sub> for 2 h at 37°C. Membranes were washed four times for 15 min and incubated 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:2000) in TBS-T containing 2% milk powder. PVDF membranes were washed four times for 10 min in TBS-T, P-gp was detected using chemiluminescence reagents (ECL). Molecular weights were determined with a calibration curve made with Bio-Rad standards: myosin (200 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase *b* (97 kDa), bovine serum albumine (66 kDa) and ovalbumine (45 kDa).

### 2.5. Triton X-114 phase partitioning

Brain capillary proteins (5 mg/ml) were solubilized at 4°C for 30 min in PB containing 2% Triton X-114. The mixture was centrifuged at 100 000 × *g* for 30 min at 4°C and the pellet was resuspended in PB and 1% SDS. The supernatant was layered over a cushion composed of 1:10 volume of 250 mM sucrose and incubated for 10 min at 30°C. The phase separation was completed by centrifuging the turbid mixture at 2000 × *g* 5 min at 30°C. The upper

deterge  
gent-ri

2.6. Di

Cap  
were r  
mg/m  
SDS. 7  
β-merc  
endogl  
hibitor  
100 μ  
overni  
and W  
above.

2.7. Pe

The  
Biosys  
tario) t  
istry. I  
HPLC

2.8. Im

Brai  
were w  
concen  
solubili  
were di  
0.625%  
trifuge  
was ad  
overnig  
contain  
SDS (I  
were in  
for 4 r

Hea

Fig. 1. D  
beef (B)  
temperat  
membran  
in Materi

detergent-poor phase was separated from the lower detergent-rich phase with a pasteur pipette.

### 2.6. Deglycosylation

Capillaries and crude membranes from CH<sup>R</sup>C5 cells were resuspended in HM at a protein concentration of 6 mg/ml. Proteins were solubilized 10 min at 25°C in 0.5% SDS. The samples were diluted in HM containing 0.25%  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 2 U/mg protein of endoglycosidase F/*N*-glycosidase F and proteinase inhibitors (2  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A and 100  $\mu$ g/ml bacitracin). Deglycosylation was carried out overnight at 25°C. Laemmli's sample buffer was added and Western blot analysis was performed as described above.

### 2.7. Peptide synthesis

The peptide VQEALD was synthesized with an Applied Biosystems synthesizer model 431A (Mississauga, Ontario) using Fmoc (9-fluoronylmethyloxycarbonyl) chemistry. Peptide purity was verified with a semipreparative HPLC column.

### 2.8. Immunoprecipitation

Brain capillaries and membranes from CH<sup>R</sup>C5 cells were washed and resuspended in TBS (pH 7.6) at a protein concentration of 1 mg/ml. SDS (0.5%) was added and the solubilization was carried out for 30 min at 25°C. Samples were diluted (1:5) in TBS containing 1.25% Triton X-100, 0.625% deoxycholate and proteinase inhibitors, and centrifuged at 14000  $\times g$  for 10 min. MAb C219 (3  $\mu$ g/ml) was added to the supernatants, and samples were incubated overnight at 4°C. Protein A sepharose equilibrated in TBS containing 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate and 0.1% SDS (RIPA) was added (120  $\mu$ l/ml). The suspensions were incubated for 1 h at 25°C and centrifuged at 8000  $\times g$  for 4 min. Pellets were washed once with RIPA buffer,

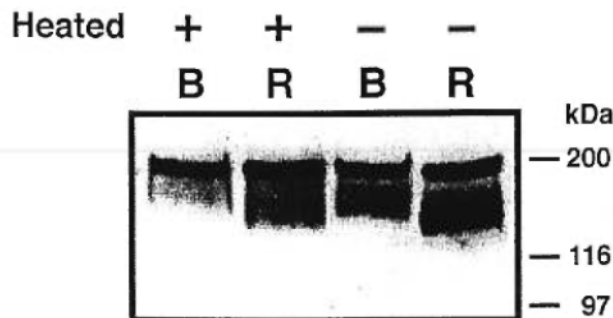


Fig. 1. Detection of P-gp from brain capillaries. Proteins (10  $\mu$ g) from beef (B) and rat (R) were heated 3 min or solubilized 30 min at room temperature before SDS-PAGE. Proteins were transferred onto PVDF membranes and analyzed by Western blot with MAb C219 as described in Materials and methods.

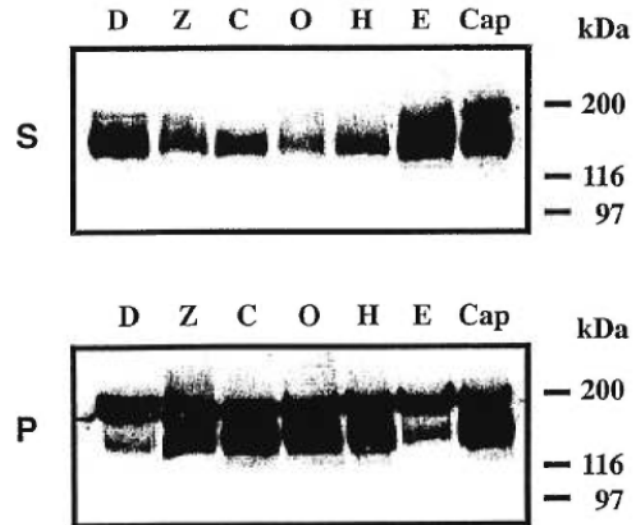


Fig. 2. Solubilization of P-gp from brain capillaries. Brain capillary proteins (0.5 mg/ml) from rat were solubilized 30 min at 25°C in homogenate medium with the following detergents: 0.4% deoxycholate (D), 0.1% Zwittergent 3-14 (Z), 1.2% CHAPS (C), 1.4% *n*-octylglucoside (O), 1.3% Hecameg (H) and 1.5% Elugent (E). Proteins (10  $\mu$ g) from supernatants (S), pellets (P) and untreated capillaries (Cap) were resolved by SDS-PAGE and detected by Western blot analysis.

once with RIPA diluted 1:10 in TBS and twice with TBS. Sample buffer was added to the pellet for SDS-PAGE and Western blot analysis as described above.

### 3. Results

Two proteins with apparent molecular mass of 155 and 190 kDa from beef and rat brain capillaries were immunodetected with the MAb C219. The detection of p155 was significantly reduced by heating the samples from both species (Fig. 1). However, p190 was always present with the same intensity, whether the samples were heated or not before electrophoresis.

The two proteins revealed by MAb C219 possess different patterns of solubilization by various detergents. At twice their critical micellar concentrations (CMC), several detergents solubilized very well p155 from brain capillaries (Fig. 2). Deoxycholate, an anionic detergent, and elugent, a mixture of non-ionic detergents, were the most effective in solubilizing p155 (Fig. 2). These detergents also efficiently solubilized P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells (Table 1). In contrast, p190 was extracted only by SDS (Table 1) and by urea (results not shown).

Triton X-114 phase partitioning is a method used to separate the proteins according to their solubilization by this detergent [24] and it allows to evaluate the degree of hydrophobicity of proteins [25]. Fractionation of beef and rats brain capillary proteins with Triton X-114 showed that the two proteins detected by MAb C219 partitioned in different phases (Fig. 3). P155 was extracted by Triton

Table 1

Solubilization of P-gp from the membrane of CH<sup>R</sup>C5 cells and proteins from brain capillaries detected with MAb C219

Detergent (concentration)	% Solubilization		
	P-gp from CH <sup>R</sup> C5 cells	p155	p190
SDS (0.5%)	95	80	48
Hecameg (1.3%)	84	31	0
Octylglucoside (1.4%)	82	15	0
Elugent (1.5%)	81	90	0
Zwittergent 3-14 (0.1%)	81	34	0
Deoxycholate (0.4%)	78	88	0
CHAPS (1.2%)	75	30	0

Proteins from rat brain capillaries (1 mg/ml) and CH<sup>R</sup>C5 cells were solubilized with different detergents 60 min at 25°C and immunodetected with MAb C219 as described in Materials and methods. Autoradiograms were scanned with an LKB Ultrascan XL enhanced laser densitometer and the relative area under each peak was calculated. Data shown represent the percentage of solubilization compared to the control.

X-114 and partitioned in the detergent-rich phase, while p190 was completely insoluble in Triton X-114 and remained in the first pellet. The fractionation profile of p155 and p190 was identical for beef and rat capillaries.

Both brain capillary proteins detected with MAb C219 are glycoproteins since both proteins had a different profile of migration after endoglycosidase F/*N*-glycosidase-F treatment (Fig. 4). The difference in migration rate is greater for p155 (27-28 kDa) than for p190 (7-8 kDa). The shift in the apparent molecular weight of p155 from capillaries was similar to that obtained for the P-gp of CH<sup>R</sup>C5 cells after the same deglycosylation treatment.

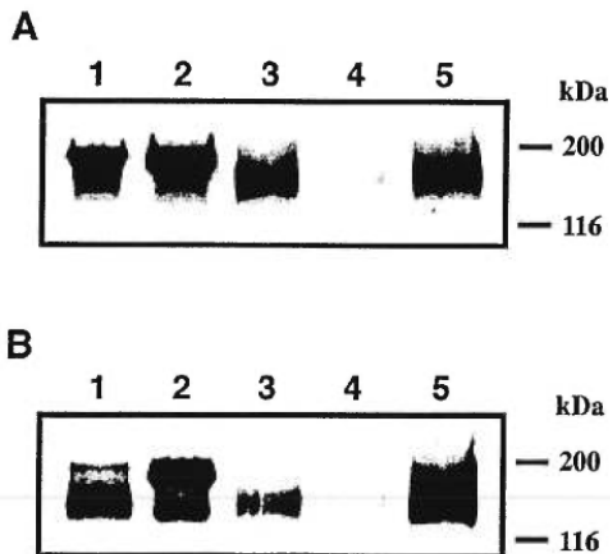


Fig. 3. Phase partitioning of brain capillary proteins with Triton X-114. Brain capillary proteins (lane 1) from beef (A) and rats (B) were solubilized in 2% (w/v) Triton X-114. After a 30 min centrifugation at 100000 × g, these were separated into pellet (lane 2) and supernatant (lane 3) fractions. Phase separation of the latter gave a detergent-poor (lane 4) and a detergent-rich phase (lane 5). The proteins from each fraction were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot analysis.

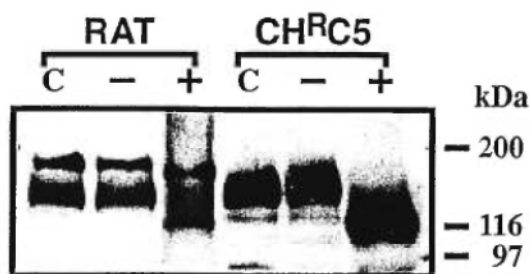


Fig. 4. Deglycosylation of brain capillary and CH<sup>R</sup>C5 membrane proteins. Solubilized proteins from rat (RAT) and CH<sup>R</sup>C5 crude membranes (CH<sup>R</sup>C5) were incubated with (+) and without (-) endoglycosidase F/*N*-glycosidase F as described in Materials and methods. Electrophoresis and immunodetection with MAb C219 were described as mentioned previously. Untreated capillary or CH<sup>R</sup>C5 cells are also shown (C).

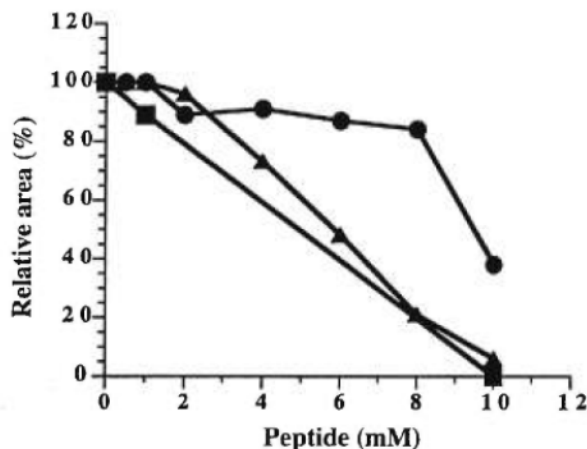


Fig. 5. Inhibition of MAb C219 binding by peptide VQEALD. Western blot analysis of the rat brain capillary proteins p155 (▲), p190 (●) and CH<sup>R</sup>C5 membranes (■) were performed as described in Materials and methods with the addition of peptide to the primary antibody incubation medium. Autoradiograms were scanned with an LKB Ultrascan XL enhanced laser densitometer and the relative area under each peak was calculated. Data shown represent the percentage of solubilization compared to the control.

Competition studies with the VQEALD peptide have shown that the detection, with MAb C219, of p155 and P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells is displaced at a lower peptide concentration than that of p190 kDa (Fig. 5). The binding of MAb C219 to the P-gp of CH<sup>R</sup>C5 cells and to p155 is completely inhibited by 10 mM peptide. At the same peptide concentration, however, binding of MAb C219 to p190 was inhibited only by 45%.

Immunoprecipitation of brain capillary proteins with MAb C219 revealed that only p155, but not p190, is immunoprecipitated (Fig. 6).

#### 4. Discussion

Two proteins bands of comparable intensity were detected by Western blot analysis of brain capillaries using MAb C219. The physicochemical characteristics of these

Fig. 6. CH<sup>R</sup>C5 capillary with M the imr Western

two p First, high s cells extrac deterg C219 tergen laries hadv that s able to propert a stro phase p190 p190 solubi experi when Fourtl *N*-deg fected conce abolis from capill: MAb A protei kDa v tant c tein s protei *N*-gly nine i immu in ske A: 190 l resista



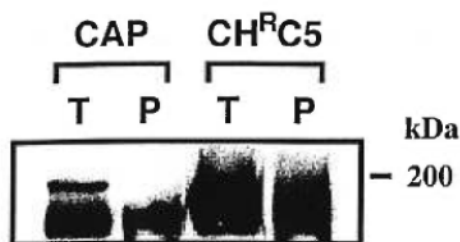


Fig. 6. Immunoprecipitation of brain capillary proteins and P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells with MAb C219. Solubilized proteins from rat brain capillaries (CAP) and CH<sup>R</sup>C5 cells (CH<sup>R</sup>C5) were immunoprecipitated with MAb C219 as described in Materials and methods. Total (T), and the immunoprecipitated proteins (P) were separated by SDS-PAGE and Western blot analysis performed as described previously.

two proteins (190 and 155 kDa) were strikingly different. First, in contrast with p190, p155 from BBB presented a high sensitivity towards heat treatment. P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells was also sensitive to heat treatment [26]. Second, extraction of brain capillary proteins with a variety of detergents indicated that the two proteins detected by MAb C219 showed different patterns of solubilization. The detergents that solubilized efficiently p155 from brain capillaries also solubilized P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells. P190 behaved very differently since SDS was the only detergent that solubilized it. Urea (8 M) was the only other agent able to extract p190. Third, comparison of the hydrophobic properties by phase partitioning of the two proteins showed a strong difference. P155 partitioned in the detergent-rich phase and behaved like a membrane protein. In contrast, p190 was insoluble in Triton X-114. It is possible that p190 is a cytoskeleton associated protein since it was only solubilized by SDS and urea. The cytoskeleton is often experimentally defined as the insoluble residue remaining when cells are extracted with a non-ionic detergent [27]. Fourth, p155 and p190 reacted very differently to the *N*-deglycosylation treatment. P155 was more strongly affected in its migration pattern than p190. Fifth, lower concentration of the VQEALD peptide were required to abolish the binding of MAb C219 to p155 and to P-gp from CH<sup>R</sup>C5 cells than to p190. Finally, among brain capillary proteins, only p155 was immunoprecipitated by MAb C219.

A cross-reactivity of MAb C219 to other membrane protein was recently reported. [19]. A protein of approx. 65 kDa was immunodetected by MAb C219 in the drug resistant cell lines, P388/ADR and P388/VCR-600. This protein seemed MDR-related and was called mini-P-glycoprotein. However, contrarily to P-gp, P-gp<sub>mini</sub> was not *N*-glycosylated neither phosphorylated at serine or threonine residues [19]. MAb C219 was also found to react immunohistochemically with striations in fast-twitch fibers in skeletal muscle [20].

A multidrug resistance associated membrane protein of 190 kDa (MRP) gene is overexpressed in adriamycin resistant HL60 cells. However, the *mdr1* gene is not

overexpressed in these cells and the level of P-gp is not detectable [28]. MRP, which binds ATP, presents a very small sequence homology with P-gp, since cross-reactivity of some antibodies against MRP is observed with P-gp [29]. However, the epitope recognized by MAb C219 is absent from the deduced amino acid sequence of MRP. These results suggest that p190 detected by MAb C219 in brain capillaries is not MRP.

In the present study, two proteins (p155 and p190) were revealed by Western blot analysis of brain capillaries with MAb C219. The results suggest that p155 is P-gp. However, cross reactivity was observed between MAb C219 and a glycoprotein of 190 kDa, probably unrelated to MDR. So, MAb C219, which is frequently used to demonstrate the presence of P-gp in tumor samples, also reacts with a distinct protein which could lead to false positive in the diagnosis of MDR in tumors.

### Acknowledgements

Special thanks are given to Dr. Vincent Vachon for his critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Sandoz Canada and the National Cancer Institute of Canada (D.A.B.).

### References

- [1] Pastan, I. and Gottesman, M.M. (1987) *N. Engl. J. Med.* 316, 1388–1393.
- [2] Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G. and Ling, V. (1985) *Nature* 316, 820–823.
- [3] Juliano, R.L. and Ling, V. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152–162.
- [4] Endicott, J.A. and Ling, V. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137–171.
- [5] Georges, E., Sharom, F.J. and Ling, V. (1990) *Adv. Pharmacol.* 21, 185–215.
- [6] Endicott, J.A., Juranka, P.F., Sarangi, F., Gerlach, J.H., Deuchars, K.L. and Ling, V. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 4075–4081.
- [7] Marie, J.P. (1990) *Médecine/Science* 6, 443–448.
- [8] Van der Blik, A.M., Baas, F., Ten Houte de Lange, T., Kooiman, P.M., Van der Velde-Koerts, T. and Borst, P. (1987) *EMBO J.* 6, 3325–3331.
- [9] Kartner, N. and Ling, V. (1989) *Sci. Am.* March, 44–52.
- [10] Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M. and Pastan, I. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 265–269.
- [11] Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. and Bertino, J.R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 695–698.
- [12] Tsuji, A., Terasaki, T., Takabatake, Y., Tenda, Y., Tamai, I., Yamashita, T., Moritani, S., Tsuruo, T. and Yamashita, J. (1992) *Life Sci.* 51, 1427–1437.
- [13] Jetté, L., Têtu, B. and Béliveau, R. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1150, 147–154.
- [14] Reese, T.S. and Karnovsky, M.J. (1967) *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
- [15] Brightman, M.W. (1977) *Exp. Eye Res.* 25 (Suppl. 1), 1–25.
- [16] Algers, G., Karisson, B. and Sellström, A. (1986) *Neurochem. Res.* 11, 661–670.

- [17] Schinkel, A.H., Smit, J.J.M., Van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., Van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., Te Riele, H.P.J., Berns A.J.M. and Borst P. (1994) *Cell* 77, 491–502.
- [18] Georges, E., Bradley, G., Garipey, J. and Ling, V. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 152–156.
- [19] Kaway, K., Kusano, I., Ido, M., Sakurai, M., Shiraishi, T. and Yatani, R. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2, 804–810.
- [20] Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. and Willingham, M.C. (1989) *Histochem. Cytochem.* 37, 159–164.
- [21] Kartner, N., Riodan, J.R. and Ling, V. (1983) *Science* 222, 1285–1288.
- [22] Dallaire, L., Tremblay, L. and Béliveau, R. (1991) *Biochem. J.* 276, 745–752.
- [23] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680–685.
- [24] Bordier, C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1604–1607.
- [25] Vachon, V., Pouliot, J.F., Laprade, R. and Béliveau, R. (1990) *Biochem. Cell Biol.* 69, 206–211.
- [26] Greenberger, L.M., Williams, S.S., Georges, E., Ling, V. and Horwitz, S.B. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 506–510.
- [27] Sheng, Z., Vanderpuye, O.A., Hull, S.R., Carraway, C.A. and Carraway, K.L. (1989) *J. Cell. Biochem.* 40, 453–466.
- [28] Marquardt, D., McCrone, S. and Center, M.S. (1990) *Cancer Res.* 50, 1426–1430.
- [29] Krishnamachary, N. and Center, M.S. (1993) *Cancer Res.* 53, 3658–3661.

## P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain

Édith BEAULIEU\*, Michel DEMEULE\*, Lucian GHITESCU† and Richard BÉLIVEAU\*‡<sup>1</sup>

\*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie-Biochimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8, and ‡Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada H1W 2C4, and †Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Luminal membranes of the vascular endothelium were isolated from brain, heart and lungs by modification of their density. The presence of P-glycoprotein (P-gp) was detected by Western blotting in luminal membranes from the endothelium of the three tissues. Strong enrichment in brain capillary luminal membranes, compared with brain capillaries (17-fold) and whole membranes (400–500-fold), indicates that P-gp is mainly located on the luminal side of the brain endothelium. Western blotting was also performed with antibodies directed against GLUT1, glial fibrillary acidic protein, adaptin, IP<sub>3</sub>R-3, integrins  $\alpha v$  and collagen IV as controls to determine whether the preparations were con-

taminated by other membranes. Strong enrichment of GLUT1 in brain capillary luminal membranes (9.9-fold) showed that the preparation consisted mainly of endothelial cell plasma membranes. Poor enrichment of glial fibrillary acidic protein (1.4-fold) and adaptin (2.4-fold) and a decreased level of IP<sub>3</sub>R-3, integrins  $\alpha v$  and collagen IV excludes the possibility of major contamination by astrocytes or internal and anti-luminal membranes. High levels of P-gp in the luminal membranes of brain capillary endothelial cells suggests that it may play an important role in limiting the access of anti-cancer drugs to the brain.

### INTRODUCTION

The multidrug resistance phenotype, characterized by the over-expression of P-glycoprotein (P-gp), is a major problem encountered during chemotherapy [1,2]. P-gp, a member of the ABC transporter superfamily, is a glycosylated 140–170 kDa protein with 12 transmembrane domains and two cytoplasmically located ATP-binding sites. It has been shown to actively transport a wide variety of agents, including vinca alkaloids, colchicine, antibiotics and anthracyclines, out of cells by an ATP-dependent mechanism, thus reducing their cytosolic concentration [3–5]. P-gp is expressed in some chemotherapy-resistant tumours [6] and in many normal tissues [7,8,9] in which its physiological function still remains unclear in spite of suggested roles in detoxification by excluding toxins from normal cells and secretion of metabolites into bile, urine and the gastrointestinal tract [7,8,10]. Very high levels of P-gp were found particularly in brain capillaries [8,11], where it interacts with various drugs [12] and appears to play a critical role in host defence against certain lipophilic toxins [13].

Immunohistological studies have suggested that P-gp is localized in the luminal membrane of endothelial cells forming brain blood vessels [14,15]. It may thus contribute to multidrug resistance in brain tumours by expelling drugs from the endothelial cells into the circulation in addition to extruding them from tumoral cells [16]. P-gp may contribute greatly to the properties of the blood–brain barrier, where blood vessels are less permeable than in other tissues such as the heart and lungs. Determination of its cellular localization in blood vessels is important to understand its physiological function. It may also help to explain why combinations of chemotherapeutic agents and P-gp blockers are more toxic than expected and thereby eventually help to overcome this barrier.

In this study, luminal membranes from brain, heart and lungs were isolated by a method previously used for lung blood vessels [17]. The density of the endothelial luminal membrane is modified with cationic colloidal silica coated with a polyanion cross-linker, thus allowing its isolation by centrifugation (Figure 1). Immunoblotting analysis of P-gp, using the monoclonal antibody (mAb) C219 and the polyclonal antibody (pAb) anti-(mdr Ab-1), showed the presence of P-gp in the luminal membranes of the endothelial cells forming blood vessels in all three tissues studied, but it was most strongly enriched in the brain capillaries.

### MATERIALS AND METHODS

#### Chemicals

Dextran T-70 and fast flow Protein A–Sepharose were purchased from Pharmacia LKB Biotechnology (Montreal, Que., Canada). Electrophoresis reagents and Tween 20 were products of Bio-Rad (Mississauga, Ont., Canada). mAb C219 was from ID Labs (London, Ont., Canada), anti-[glial fibrillary acidic protein (GFAP)] and anti- $\alpha$ -adaptin were from Sigma (St Louis, MO, U.S.A.), anti-IP<sub>3</sub>R-3 was from Transduction Laboratories (Mississauga, Ont., Canada), anti-(integrin  $\alpha v$ ) was from Chemicon International (Temecula, CA, U.S.A.) and anti-(collagen IV) (mAb M3F7) was from the Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, IA, U.S.A.). pAb anti-GLUT1 was from Eastacres Biologicals (Southbridge, MA, U.S.A.). Horse-radish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG, donkey anti-rabbit IgG and enhanced chemiluminescence reagents were obtained from Amersham (Oakville, Ont., Canada). Endoglycosidase F/N-glycosidase F and Hepes were from Boehringer-Mannheim (Laval, Que., Canada), SDS was from Pierce

Abbreviations used: HB, homogenate buffer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GLUT1, Glucose transporter; IAAP, [<sup>125</sup>I]iodoarylazidoprazosin; mAb, monoclonal antibody; pAb, polyclonal antibody; MBS, Mes-buffered saline; P-gp, P-glycoprotein; TBS, Tris-buffered saline; TBS-Tw: TBS/Tween 20.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be sent at the address with the symbol\*.

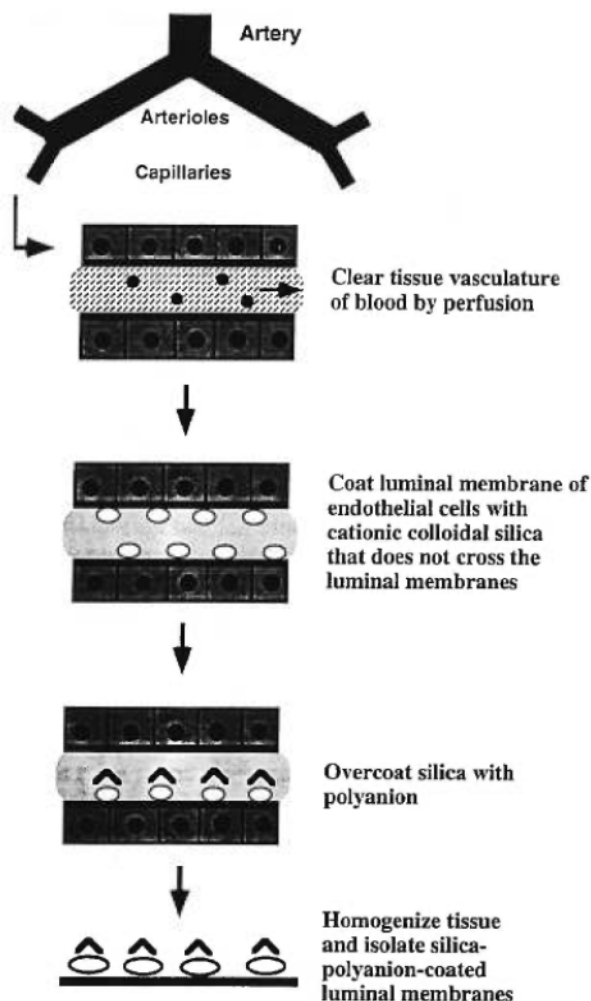


Fig. 1. Outline of the procedure used for isolating luminal membranes of endothelial cells.

Chicago, IL, U.S.A.) and [ $^{125}$ I]iodoarylazidoprazosin (IAAP) from Du Pont (Mississauga, Ont., Canada). All other reagents were purchased from Sigma.

Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (St. Constant, Que., Canada).

#### Whole membranes

Whole membranes from the endothelium of whole brain, heart and lungs were prepared as described by Jacobson et al. [17] as outlined in Figure 1. Briefly, brain, heart or lung microvasculature was coated with colloidal silica and polyacrylate by perfusion with: (1) Dulbecco's modified Eagle's medium/nitrogen (DMEM/N<sub>2</sub>) (25–30 °C) to remove blood from the vasculature and to stabilize the temperature; (2) Mes-buffered saline, pH 6.0 (MBS) to adjust the pH for coating; (3) colloidal silica; (4) MBS to wash unbound silica; (5) 1% sodium polyacrylate in MBS. The vessels were then homogenized in Hepes-buffered sucrose, passed through a nylon monofilament net, diluted with an equal volume of 1.02 g/ml Nycodenz and centrifuged to isolate silica-

coated plasmalemmal fragments and eliminate contaminating debris.

#### Whole membranes

Tissues were homogenized in 8 vol. of 250 mM sucrose/5 mM Hepes/Tris, pH 7.5. Homogenates were centrifuged at 3000 *g* for 10 min at 4 °C, and the supernatants were centrifuged at 33000 *g* for 30 min at 4 °C. Pellets were resuspended in homogenate buffer (HB) containing 50 mM mannitol and 20 mM Hepes/Tris, pH 7.5, and stored at –80 °C.

#### Brain capillaries

Capillaries were purified from brain cortex by the method of Dallaire et al. [18] with slight modifications as described previously [19].  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase activity was enriched at least 15-fold.

#### Western-blot analysis

Proteins were solubilized in 0.5% SDS in HB for 30 min at 25 °C, centrifuged at 50000 *g* for 15 min, and supernatant proteins were measured using a micro-BCA (bicinchoninic acid) kit (Pierce). SDS/PAGE and P-gp immunodetection with mAb C219 were performed as described previously [19]. Immunodetection of P-gp with pAb anti-mdr (Ab-1) was performed with slight modifications. All steps were carried out in Tris-buffered saline/0.05% Tween, pH 8.0 [TBS-Tw (0.05%)]. The primary antibody was diluted 1:200, and the secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (from donkey), was diluted 1:2000 in 1% powdered skimmed milk in TBS-Tw. Immunodetection of GLUT1 was performed as described by Pouliot and Béliveau [20]. Immunodetection of all other proteins was carried out in TBS containing 0.1% Tween 20 [TBS-Tw (0.1%)]. The primary antibodies were diluted 1:500 in TBS-Tw (0.1%) containing 1% BSA and 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, and the secondary antibodies (sheep anti-mouse IgG or donkey anti-rabbit IgG) were diluted 1:1000 in 5% milk in TBS-Tw (0.1%). For the immunodetection of IP<sub>3</sub>R-3 and integrin  $\alpha$ v, samples were heated at 100 °C for 5 min before electrophoresis. Molecular masses were determined using a calibration curve made with Bio-Rad standards: myosin (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), phosphorylase *b* (97 kDa), BSA (66 kDa) and ovalbumin (45 kDa).

#### Deglycosylation

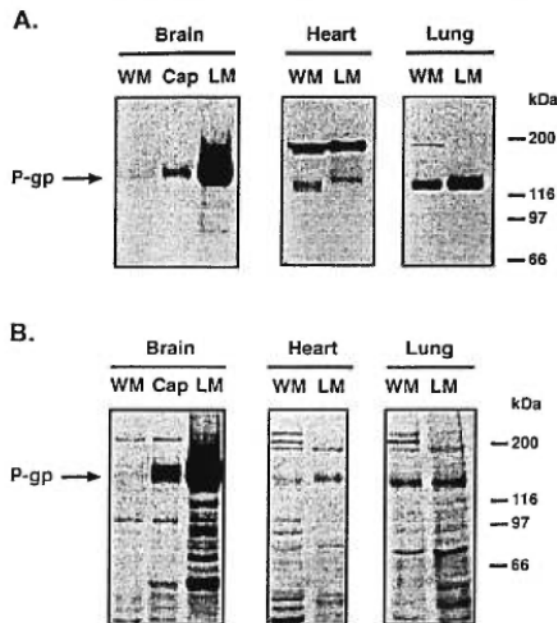
Capillaries were resuspended in HM at a protein concentration of 6 mg/ml, and solubilized for 10 min at 25 °C in 0.5% SDS. The samples were diluted in HM containing 0.25% 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 2 units of endoglycosidase F/N-glycosidase F/mg of protein and protease inhibitors (2  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A and 100  $\mu$ g/ml bacitracin). Deglycosylation was carried out overnight at 25 °C. Laemmli's sample buffer was added, and Western-blot analysis was performed as described above.

#### Photoaffinity labelling

Photoaffinity labelling with [ $^{125}$ I]IAAP was performed as described by Jetté et al. [21].

#### RESULTS

Immunodetection of P-gp was performed using two different antibodies, mAb C219 (Figure 2A) and pAb anti(mdr Ab-1) (Figure 2B), both recognizing a conserved C-terminal linear



**Figure 2** Immunodetection of P-gp in luminal membranes

After solubilization, proteins from whole membranes (WM) (30  $\mu$ g), endothelial luminal membranes (LM) from heart (30  $\mu$ g), lungs (30  $\mu$ g) and brain (3  $\mu$ g) and brain capillaries (Cap) (3  $\mu$ g) were resolved on a single gel by SDS/PAGE. Immunodetection with mAb C219 (A) and pAb Ab-1 (B) was performed as described in the Materials and methods section. Appropriate exposure times were chosen for the different tissues.

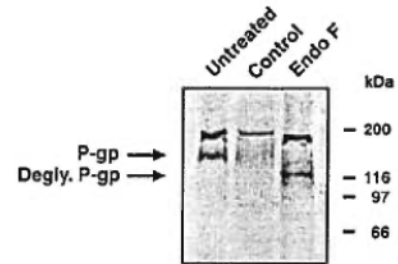
**Table 1** Enrichment of proteins in capillary luminal membranes compared with corresponding total membranes and brain capillaries

Autoradiograms were scanned with a laser densitometer and the relative area under each peak was calculated. Values are the ratio of the amount of protein detected in capillary luminal membranes to the amount found in isolated brain capillaries or in whole membranes of the corresponding tissue

	Brain capillaries	Whole membranes		
		Brain	Heart	Lung
P-gp	17	400–500	1.2	2.2
GLUT1	9.9	240–280	—	—
GFAP	1.4	2.6	—	—
Adaptin	2.4	3.5	0.24	2.7
iP <sub>3</sub> R-3	0.2	9.2	0	0.3
Integrin $\alpha$ v	0.4	0.3	0.2	0.2
Collagen IV	0.3	7.5	0.2	0.9

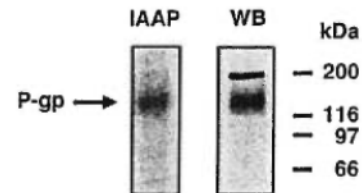
sequence. P-gp was detected in whole tissue membranes and luminal membranes isolated from the capillary endothelium of brain, heart and lungs, and in brain capillaries. In brain tissues, it was enriched 17-fold in luminal membranes compared with capillaries and 400–500-fold over whole membranes (Table 1). These results confirmed that P-gp is localized on the luminal side of the endothelial cells of the blood–brain barrier. P-gp was not enriched in the luminal membranes of heart capillaries and was only enriched 2-fold in those of the lung (Table 1).

Since two proteins (p155 and p190 kDa) were detected by the mAb C219, deglycosylation and photoaffinity labelling with IAAP were performed to identify which protein was P-gp. First,



**Figure 3** Deglycosylation of P-gp from brain capillaries

Solubilized brain capillary proteins were incubated for 16 h at 4 °C in the presence (Endo F) or absence (Control) of endoglycosidase F/N-glycosidase F, as described in the Materials and methods section. The samples and untreated brain capillary proteins (Untreated) were resolved by SDS/PAGE. Immunodetection with mAb C219 was performed as described in the Materials and methods section.



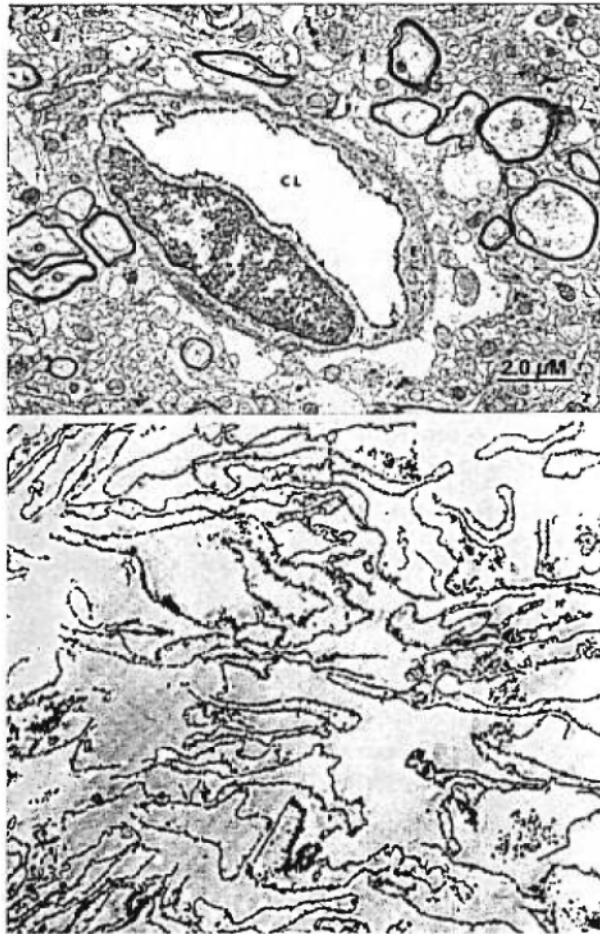
**Figure 4** Photoaffinity labelling of P-gp in brain capillaries

Brain capillary proteins (50  $\mu$ g) were incubated with IAAP, irradiated at 254 nm and immunoprecipitated with mAb C219 as described previously [21]. Proteins were then resolved by SDS/PAGE. Gels were dried and exposed to Kodak films (IAAP). Untreated brain capillary proteins (10  $\mu$ g) were resolved by SDS/PAGE, and Western-blot analysis was performed with mAb C219 as described in the Materials and methods section (WB).

deglycosylation of brain capillary proteins (Figure 3) shifted the apparent molecular mass of p155 to 130 kDa, whereas that of p190 was only reduced by 5 kDa. The decrease of 25 kDa is in agreement with previous results [22], indicating that p155 is P-gp. Second, photoaffinity labelling with IAAP (Figure 4) confirmed that p155 is P-gp, since it is photolabelled by IAAP, whereas p190 is not.

A brain capillary is seen in cross-section in electron microscopy (Figure 5A). The capillary lumen (CL) is surrounded by the luminal membrane of endothelial cells (E). The luminal membrane is coated with electron-dense silica/polyanion which is seen as block dots. Electron microscopy also shows that the final preparation is almost exclusively composed of luminal membranes from capillaries coated with electron-dense silica/polyanion (Figure 5B). Thus the method that was previously used to isolate lung luminal membranes can be used successfully with tissues other than lung.

Luminal membrane preparations were further characterized by immunodetecting various membrane markers. Immunodetection of the glucose transporter GLUT1 and GFAP, an astrocyte-related protein, was performed as a first control (Figure 6A) to determine the cellular membrane type. Two different isoforms of GLUT1 were detected. An isoform of 52 kDa was enriched 10-fold in brain capillary luminal membranes (Table 1). This isoform is a good marker for endothelial cells of the brain since it is expressed selectively in the brain microvascular endothelium in both luminal and abluminal membranes [23]. Thus enrichment of this isoform indicates that this preparation isolated from brain is vascular endothelium. Another GLUT1 isoform of 45 kDa was

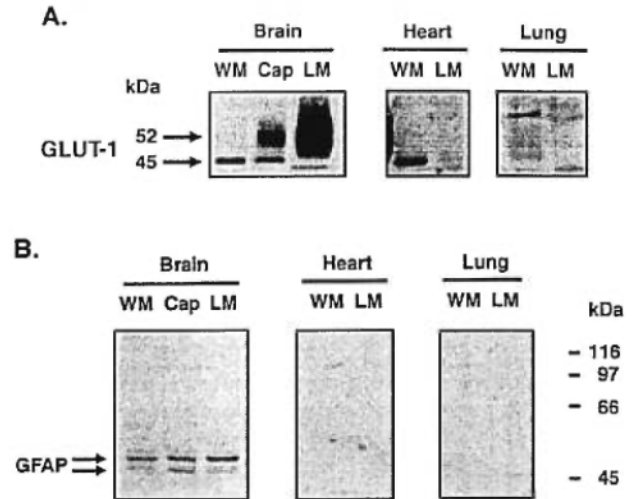


**5 Electron micrographs of luminal membranes from brain**

ss-sectional view of brain capillary endothelial cells (E) after coating with cationized silica and polyanion cross-linker which surround the capillary lumen (CL). (B) The final preparation coated with electron-dense silica/polyanion which is seen as black dots.

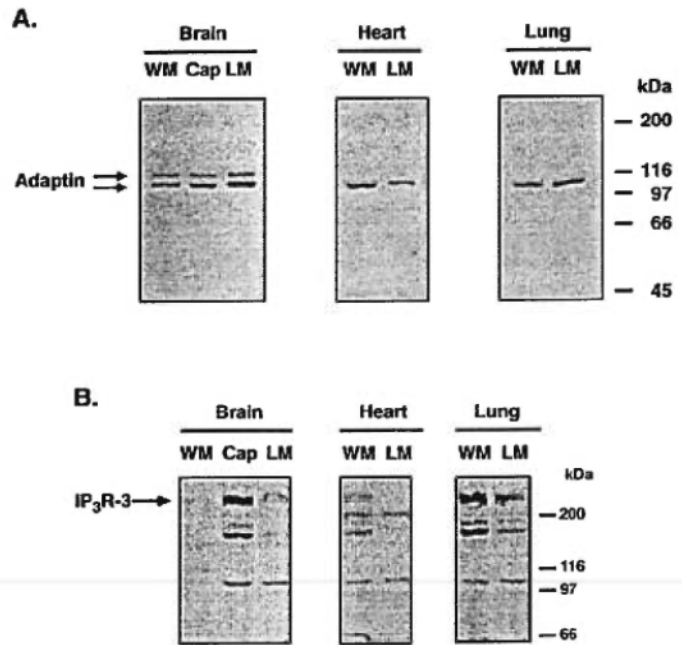
ted in whole membranes and capillaries isolated from brain ot in luminal membranes from brain blood vessels. GLUT1 not detected in the luminal membranes of the endothelia lungs and heart. This absence is not surprising since the ular bed of these tissues is not a site of expression of this in, according to immunohistochemical studies [24]. Im- odetection of GFAP (Figure 6B) revealed two proteins of t 50 kDa in whole membranes, capillaries and capillary al membranes from brain. These proteins were weakly hed in capillary luminal membranes from brain compared brain capillaries (1.4-fold) and whole membranes (2.6-fold) le 1). This indicates a minor contamination of the brain al membrane preparation by astrocytes. No GFAP was ted in capillary luminal membranes from heart or lung as ted. These results suggest that mainly plasma membranes of theelial cells were present in the luminal membrane rations.

ntamination by internal membranes was evaluated by monodetection of adaptin (Figure 7A), a protein located in the i apparatus membrane, and IP<sub>3</sub>R-3 (Figure 7B), a protein ed in the endoplasmic-reticulum membrane. With anti- tin, two proteins that correspond to adaptin (105 and 1Da) were detected in the capillary luminal membranes,



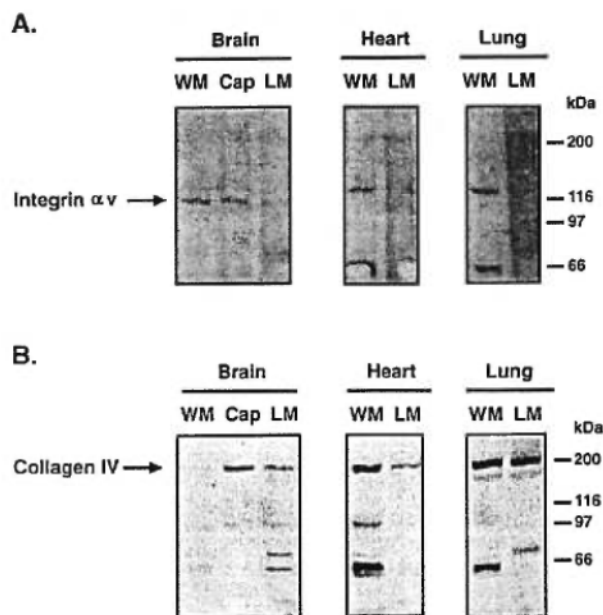
**Figure 6 Determination of cellular membrane type**

(A) After solubilization, proteins from whole membranes of each tissue (WM) (30  $\mu$ g), endothelial luminal membranes (LM) from heart (30  $\mu$ g), lungs (30  $\mu$ g) and brain (3  $\mu$ g) and brain capillaries (Cap) (3  $\mu$ g) were resolved on a single gel by SDS/PAGE. Immunodetection with pAb anti-GLUT1 was performed as described in the Materials and methods section. (B) After solubilization, proteins from brain capillaries (Cap) (15  $\mu$ g), whole membranes (WM) and luminal membranes (LM) from brain (15  $\mu$ g), heart (30  $\mu$ g) and lung (30  $\mu$ g) capillaries were resolved on a single gel by SDS/PAGE. Immunodetection with mAb anti-GFAP was performed as described in the Materials and methods section. Appropriate exposure times were chosen for the different tissues.



**Figure 7 Immunodetection of intracellular membrane markers**

(A) After solubilization, proteins from brain capillaries (Cap) (15  $\mu$ g), whole membranes (WM) and luminal membranes (LM) from brain (15  $\mu$ g), heart (30  $\mu$ g) and lung (30  $\mu$ g) capillaries were resolved on a single gel by SDS/PAGE. Immunodetection with mAb anti-adaptin was performed as described in the Materials and methods section. (B) After solubilization, proteins from brain capillaries (Cap) (20  $\mu$ g), whole membranes (WM) (20  $\mu$ g) and luminal membranes (LM) from brain (20  $\mu$ g), heart (15  $\mu$ g) and lung (20  $\mu$ g) capillaries were resolved on a single gel by SDS/PAGE. Immunodetection with mAb directed against anti-IP<sub>3</sub>R-3 was performed as described in the Materials and methods section. Appropriate exposure times were chosen for the different tissues.



**Figure 8** Immunodetection of anti-luminal and basal membrane markers

For solubilization, proteins from brain capillaries (Cap) (20  $\mu$ g), whole membranes (WM) (20  $\mu$ g) and luminal membranes (LM) from brain (20  $\mu$ g), heart (15  $\mu$ g) and lung (20  $\mu$ g) capillaries were resolved on a single gel by SDS/PAGE. Immunodetection with mAb 1960 directed against Integrin  $\alpha v$  (A) and with mAb M3F7 directed against collagen IV (B) was formed as described in the Materials and methods section. Appropriate exposure times were used for the different tissues.

Whole membranes and capillaries isolated from the brain. This protein was only weakly enriched in brain luminal membranes compared with brain capillaries (2.4-fold) and whole membranes from brain (3.5-fold, Table 1). This weak enrichment could be due to the fact that adaptin has also been reported in plasma membrane. Only one band was detected in the luminal membrane capillaries and in whole membranes from heart and lungs. In heart, expression of adaptin was weaker in capillary luminal membranes (0.2-fold) than in whole membranes in contrast with lung where it was enriched, but only 2.7-fold (Table 1). IP<sub>3</sub>R-3 was detected as a protein of about 300 kDa in the three fractions isolated from brain. The enrichment of this protein in the luminal membranes, compared with whole membranes, was 9.2-fold (Table 1). In contrast, this protein was expressed at lower levels in capillary luminal membranes than in brain capillaries (0.2-fold). In heart, no IP<sub>3</sub>R-3 was detected in capillary luminal membranes, whereas in lung, IP<sub>3</sub>R-3 levels in capillary luminal membranes were very low compared with whole membranes (0.3-fold). These very low levels of adaptin and IP<sub>3</sub>R-3 in capillary luminal membrane preparations from the three tissues indicate weak contamination by Golgi apparatus and endoplasmic reticulum membranes.

Contamination of capillary luminal membrane preparations by anti-luminal membranes and basal laminae was evaluated by immunodetection of integrin  $\alpha v$  (Figure 8A) and collagen IV (Figure 8B). The integrin  $\alpha v$  (125 kDa) was detected at very low levels in capillary luminal membranes and at higher levels in brain capillaries and whole membranes. In brain tissues, the expression in capillary luminal membranes was 0.4-fold that in brain capillaries and 0.3-fold that in whole membranes (Table 1). In heart and lungs, the ratio of expression levels between capillary luminal membranes and whole membranes was only 0.2-fold.

Thus very little anti-luminal membrane contaminated the capillary luminal membrane preparations. Collagen IV (185 kDa) was found in capillary luminal membranes from the three tissues studied. In brain tissues, it was enriched 7.5-fold in capillary luminal membranes compared with whole membranes (Table 1) but only 0.3-fold when compared with brain capillaries. In heart, the expression level was lower in capillary luminal membranes than in whole membranes (0.2-fold) and in lungs the expression level was similar in both capillary luminal membranes and whole membranes. These lower detection levels, compared with brain capillaries and whole membranes from heart and lungs, exclude the possibility of a major contamination by basal laminae in all capillary luminal membrane preparations.

## DISCUSSION

Isolation of the luminal membranes from endothelial cells of blood vessels of the lungs, devoid of blood cells, with high yield and purity was previously accomplished by Jacobson et al. [17]. This method takes advantage of the exposed nature of luminal membranes of the endothelial cells to coat them, by perfusion, with a layer of cationic colloidal silica which is then overcoated with a polyanion cross-linker. The density of the luminal membranes is thus changed, allowing their isolation by centrifugation. In this paper, the method was applied to lung, heart and brain.

The high level of P-gp expression and its strong enrichment in brain capillary luminal membranes confirmed its localization on the luminal side of endothelial cells forming the blood vessels of the brain. This also suggests a fundamental role for P-gp at this site. Possible involvement of P-gp in the blood-brain barrier was previously demonstrated using various methods. Transport of vincristine by primary cultured bovine brain capillary endothelial cells, which is vectorial, suggests that P-gp functions as a drug-efflux pump at the luminal side of the endothelial cells of brain capillaries [25]. This hypothesis is reinforced by the vectorial transport of cyclosporin A, suggesting a detoxifying role for P-gp [26]. Mice with genetic disruption of class I P-gp accumulate higher levels of drugs in the brain, supporting the notion that P-gp is involved in blood-brain barrier functions [27]. These results suggest that P-gp may contribute to multidrug resistance in brain tumours by blocking drug entry into the brain or tumour cells.

Detection of P-gp in luminal membranes from lungs suggests that it is also localized on the luminal side of the lung endothelium. However, the relatively weak enrichment suggests that it may also be located in other lung cells. In fact, the presence of P-gp in bronchial cells has previously been reported [28]. In the heart, P-gp was detected in endothelial luminal membranes but it does not appear to be restricted to this region since it was not enriched in luminal membranes. The detection of P-gp in the myocardium [28] may explain the absence of enrichment in the heart capillary luminal membranes.

Proteins other than P-gp were studied as controls to evaluate the purity of the luminal membrane preparations. The strong enrichment of GLUT1 (55 kDa isoform) in luminal membranes from brain endothelium indicates that the material is vascular endothelium. The absence of the 45 kDa isoform indicates that the luminal membrane preparation is not contaminated with non-endothelial cells since this isoform was shown to be associated with such cells [29]. However, the presence of the 45 kDa isoform in whole heart membranes and its absence from heart capillary luminal membranes was expected since it was previously demonstrated in cardiac myocytes [30,31]. This indicates that there was no major contamination of the heart capillary luminal membrane preparations by myocytes.

Contamination of luminal membrane preparations by astrocytes, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, anti-luminal membranes and basal laminae was evaluated by immunodetection of GFAP, adaptin, IP<sub>3</sub>R-3, integrin  $\alpha v$  and collagen IV respectively. Absence or very low enrichment of all these markers in the luminal membrane fractions from each tissue showed that preparations were not contaminated by these membranes to a great extent. Thus the strong co-enrichment of P-gp (400-fold) and GLUT1 (240–280-fold) in brain capillary luminal membranes compared with whole brain membranes versus low enrichment of other proteins such as IP<sub>3</sub>R-3 (9.2-fold) and integrin IV (7.5-fold) and still lower enrichment of other markers showed clearly that P-gp is mainly a luminal protein in the brain capillary endothelium.

In conclusion, in the lungs and heart, P-gp is present in both luminal membranes but is not restricted to this site. In the brain endothelium, the luminal membrane appears to be the major site of P-gp expression. This localization of P-gp adds a new and important dimension to the tissue distribution of anticancer drugs, since it indicates that part of the multidrug resistance in the clinical treatment of cancer could originate from the vascular endothelium, in addition to the induced expression of P-gp in the drug-resistant cancer cells.

Thank Marie-France Bélanger and Julie Poirier for their technical support, and Robert Vachon for his critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from NOVARTIS Canada Inc. É. B. received a scholarship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

## REFERENCES

- Ling, V., Kartner, N., Sudo, T., Siminovich, L. and Riordan, J. R. (1983) *Cancer Treatment Rep.* **67**, 869–874
- Georges, E., Sharom, F. J. and Ling, V. (1990) *Adv. Pharmacol.* **21**, 185–215
- Doige, C. A. and Sharom, F. J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1109**, 161–171
- Nielsen, D. and Skovsgaard, T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1139**, 169–183
- Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 385–427
- Pastan, I. and Gottesman, M. M. (1991) *Annu. Rev. Med.* **42**, 277–286
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. and Willingham, M. C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7735–7738
- 8 Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R. and Bertino, J. R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 695–698
- 9 Buschman, E., Arceci, R. J., Croop, J. M., Che, M., Arias, I. M., Housman, D. E. and Gros, P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18093–18099
- 10 Smith, J. J. M., Schinkel, A. H., Oude Elferink, R. P. J., Groen, A. K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A. A. M., Ottenhoff, R., van der Lugt, N. M. T. and van Roon, M. A. (1993) *Cell* **75**, 451–462
- 11 Jetté, L., Têtu, B. and Béliveau, R. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1150**, 147–154
- 12 Jetté, L., Murphy, G. F., Leclerc, J.-M. and Béliveau, R. (1995) *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1701–1709
- 13 Schinkel, A. H., Smit, J. J. M., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, M. A., Mol, C. A. A. M., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., te Riele, H. P. J., Berns, A. J. M. and Borst, P. (1994) *Cell* **77**, 491–502
- 14 Sugawara, I., Hamada, H., Tsuruo, T. and Mori, S. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 727–730
- 15 Tanaka, Y., Abe, Y., Tsugu, A., Takamiya, Y., Akatsuka, A., Tsuruo, T., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Sato, O., Tamaoki, N. and Nakamura, M. (1994) *Virchows Arch.* **425**, 133–138
- 16 Henson, J. W., Cordon-Cardo, C. and Posner, J. B. (1992) *J. Neuro-Oncol.* **14**, 37–43
- 17 Jacobson, B. S., Schnitzer, J. E., McCaffery, M. and Palade, G. E. (1992) *Eur. J. Cell Biol.* **58**, 296–306
- 18 Dallaire, L., Tremblay, L. and Béliveau, R. (1991) *Biochem. J.* **276**, 745–752
- 19 Beaulieu, E., Demeule, M., Pouliot, J.-F., Averill-Bates, D. A., Murphy, G. F. and Béliveau, R. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1233**, 27–32
- 20 Pouliot, J.-F. and Béliveau, R. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1234**, 191–196
- 21 Jetté, L., Pouliot, J.-F., Murphy, G. F. and Béliveau, R. (1995) *Biochem. J.* **305**, 761–766
- 22 Yoshimura, A., Kuwazuru, Y., Sumizawa, T., Ikeda, S.-I., Ichikawa, M., Usagawa, T. and Akiyama, S.-I. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **992**, 307–314
- 23 Farrell, C. L. and Partridge, W. M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5779–5783
- 24 Baldwin, S. A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 17–46
- 25 Tsuji, A., Terasaki, T., Takabatake, Y., Tenda, Y., Tamai, I., Yamashita, T., Moritani, S., Tsuruo, T. and Yamashita, J. (1992) *Life Sci.* **51**, 1427–1437
- 26 Shirai, A., Naito, M., Tatsuta, T., Dong, J., Hanaoka, K., Mikami, K., Ohhara, T. and Tsuruo, T. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1222**, 400–404
- 27 Schinkel, A. H., Mol, C. A. A. M., Wagenaar, E., van Deemter, L., Smit, J. J. M. and Borst, P. (1995) *Eur. J. Cancer* **31A**, 1295–1298
- 28 Pavelic, Z. P., Reising, J., Pavelic, L., Kelley, D. J., Stambrook, P. J. and Gluckman, J. L. (1993) *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **119**, 753–757
- 29 Partridge, W. M., Boado, R. J. and Farrell, C. R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 18035–18040
- 30 Santalucia, T., Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Nuel, A., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A. (1992) *Endocrinology* **130**, 837–846
- 31 Kainulainen, H., Breiner, M., Schürmann, A., Martinen, A., Virjo, A. and Joost, H. G. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1225**, 275–282