



**HAL**  
open science

# Implication des radicaux libres dans l'efficacité et la toxicité des agents anticancéreux

Matthieu Sanchez

► **To cite this version:**

Matthieu Sanchez. Implication des radicaux libres dans l'efficacité et la toxicité des agents anticancéreux. Sciences pharmaceutiques. 1994. dumas-01875996

**HAL Id: dumas-01875996**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01875996>**

Submitted on 18 Sep 2018

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

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

## AVERTISSEMENT

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

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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

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

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



115 014265 6

*2<sup>e</sup> exemplaire*

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I**  
**Sciences Technologie Médecine**  
**U.F.R. de PHARMACIE**

**Domaine de la Merci - LA TRONCHE**

**ANNEE : 1994**

**N° d'ORDRE :** 7050

**Implication des radicaux libres  
dans l'efficacité et la toxicité  
des agents anticancéreux**

**THESE**

**Présentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE 1  
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Par**

**M. : SANCHEZ Matthieu**

[Données à caractère personnel]

**Cette thèse sera soutenue publiquement le : 23 novembre 1994**

**Devant M. le Professeur J. CALOP**

**Président du jury**

**et**

**M. P. BIENVENU, Pharmacien chimiste en chef**

**Directeur de thèse**

**Mme J. RIONDEL, Maître de conférences**



**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I**  
**Sciences Technologie Médecine**  
**U.F.R. de PHARMACIE**

**Domaine de la Merci - LA TRONCHE**

**ANNEE : 1994**

**N° d'ORDRE :**

**Implication des radicaux libres  
dans l'efficacité et la toxicité  
des agents anticancéreux**

**THESE**

**Présentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE 1  
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Par**

**M. : SANCHEZ Matthieu**

[Données à caractère personnel]

**Cette thèse sera soutenue publiquement le : 23 novembre 1994**

**Devant M. le Professeur J. CALOP**

**Président du jury**

**et**

**M. P. BIENVENU, Pharmacien chimiste en chef**

**Directeur de thèse**

**Mme J. RIONDEL, Maître de conférences**



A notre Président du Jury,

Monsieur le Professeur J. CALOP,  
Pharmacien, Praticien Hospitalier,  
C.H.U. de Grenoble

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse, soyez en remercié.  
Pour la qualité de votre enseignement et les nombreuses connaissances en pharmacie clinique que nous avons acquises au sein de votre service, nous tenons à vous exprimer notre gratitude ainsi que notre profond respect.

A notre Directeur de Thèse,

Monsieur P. BIENVENU,  
Pharmacien Chimiste en Chef,  
Unité de Radiobiochimie du C.R.S.S.A. de Grenoble.

Vous avez accepté de mener ce travail.  
Vous avez fait preuve d'une très grande disponibilité, et vos nombreux conseils m'ont été très précieux.  
Je vous en suis profondément reconnaissant.

A Madame J. Riondel,

Maître de Conférence,  
Service de Physiologie et Pharmacologie de l'UFR de Pharmacie de Grenoble.

Nous vous exprimons nos remerciements pour nous avoir fait l'honneur et le plaisir de bien vouloir siéger à notre jury.

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	7
<b><i>PREMIERE PARTIE :</i></b> .....	8
<b><i>GENERALITES SUR LES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX ET LES RADICAUX LIBRES</i></b> .....	8
<b>CHAPITRE I: LA CHIMIOThERAPIE ANTICANCEREUSE</b> .....	8
1. Principes généraux .....	8
1.1. Caractéristiques cinétiques des cellules et des tissus cancéreux.....	8
1.2. Chimiothérapie et cycle cellulaire.....	9
2. Mécanismes généraux d'action des cytostatiques.....	10
2.1. Interaction directe avec l'ADN.....	11
2.2.1. Les agents alkylants.....	11
2.1.2. Les agents intercalants.....	12
2.1.3. Les agents scindants .....	13
2.1.4. Les agents produisant des radicaux libres .....	13
2.2. Interaction indirecte avec l'ADN.....	13
2.2.1. Les antimétabolites.....	13
2.2.2. Les inhibiteurs de la formation des tubulines.....	14
2.2.3. Les inhibiteurs de la topoisomérase II.....	14
3. Toxicité des agents anticancéreux.....	16
3.1. Toxicité sur la moelle osseuse.....	16
3.2 Toxicité digestive .....	16
3.3. Toxicité cutanée et des phanères .....	17
3.4. Toxicité hépatique .....	17
3.5. Toxicité rénale.....	17
3.6. Toxicité vésicale.....	17
3.7. Toxicité pulmonaire .....	17
3.8. Toxicité cardiaque.....	18
3.9. Toxicité neurologique .....	18
3.10. Toxicité sur les cellules germinales .....	18
<b>CHAPITRE II :LES RADICAUX LIBRES OXYGENES</b> .....	20
1.Définition des radicaux libres .....	20
2. Les différents radicaux libres dérivés de l'oxygène .....	20
2.1. L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ).....	21
2.2. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).....	21
2.3. Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) .....	21

2.4. Les radicaux alcoxy (RO <sup>•</sup> ) et peroxy (ROO <sup>•</sup> ) .....	22
2.5. L'oxygène singulet ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> <sup>*</sup> ) .....	22
2.6. Le monoxyde d'azote (NO <sup>•</sup> ) .....	23
3. Production de radicaux libres au cours du métabolisme cellulaire normal.....	23
3.1. Production au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie.....	23
3.2. Production au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire .....	24
3.3. Production au niveau des membranes plasmiques .....	25
3.3.1. La cyclooxygénase et la lipooxygénase .....	25
3.3.2. La NADPH oxydase.....	25
3.4. Production au niveau des peroxysomes .....	25
3.5. Production au niveau du cytosol .....	26
3.5.1. Autooxydation de molécules endogènes .....	26
3.5.2. La xanthine oxydase.....	26
4. Production de radicaux libres liée au facteurs environnementaux .....	28
5. Production de radicaux libres en situation pathologique .....	28
6. L'agression radicalaire et ses sources biologiques.....	30
6.1. Attaque des lipides membranaires ou peroxydation lipidique .....	30
6.2. Attaque des protéines.....	35
6.3. Attaque des acides nucléiques.....	37
7. Les moyens de protection antiradicalaire de l'organisme.....	38
7.1. Protection par des systèmes enzymatiques .....	38
7.1.1. Les superoxyde-dismutases (SOD) .....	38
7.1.2. La catalase.....	39
7.1.3. La glutathion peroxydase séléno-dépendante (GPx) .....	39
7.1.4. La glutathion-S-transférase π .....	40
7.2. Protection par des systèmes non enzymatiques.....	40
7.2.1. L'α-tocophérol ou vitamine E .....	40
7.2.2. Le β-carotène ou vitamine A .....	41
7.2.3. L'acide ascorbique ou vitamine C .....	41
7.2.4. Les chélateurs des métaux de transition.....	41
7.2.5. Les métallothionéines.....	42
7.2.6. Le glutathion .....	42
7.2.7. Autres substances.....	42
<b><u>DEUXIEME PARTIE</u></b> .....	43
<b><i>PRODUCTION ET EFFETS DES RADICAUX LIBRES INDUITS PAR LES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX</i></b> .....	43

<b>CHAPITRE III:ANTICANCEREUX ET RADICAUX LIBRES .....</b>	<b>43</b>
1. les anthracyclines .....	43
1.1. Anthracyclines et production de radicaux libres .....	46
1.1.1. Formation du radical semi-quinone.....	46
1.1.2. Formation de l'anion superoxyde .....	47
1.1.3. Formation du radical hydroxyle .....	47
1.1.4. Formation d'un complexe anthracycline-métal .....	49
1.2 Cytotoxicité des anthracyclines et radicaux libres .....	51
1.2.1. Cytotoxicité médié par les métabolites des anthracyclines.....	51
1.2.2. Cytotoxicité médiée par les radicaux libres oxygénés:.....	52
1.2.2.1. Dégradation de l'ADN.....	52
1.2.2.2. Peroxydation lipidique.....	54
1.3. Cardiotoxicité des anthracyclines et radicaux libres .....	55
1.3.1. Production de radicaux libres par les anthracyclines au niveau cardiaque .....	56
1.3.2. La peroxydation lipidique .....	57
1.3.3. Protection par des agents antioxydants .....	58
1.3.3.1. L' $\alpha$ -tocophérol ou vitamine E.....	58
1.3.3.2. L'acide ascorbique ou vitamine C .....	59
1.3.3.3. La N-acétylcystéine .....	59
1.3.3.4. L'ICRF 187 .....	59
2. La mitomycine C (AMETYCINE*).....	60
2.1. Mitomycine C et production de radicaux libres .....	61
2.1.1. Formation du radical semi-quinone.....	61
2.1.2. Formation du radical superoxyde et du radical hydroxyle.....	61
2.2. Cytotoxicité de la mitomycine C et radicaux libres .....	63
3.La mitoxantrone (NOVANTRONE*).....	65
3.1. Mitoxantrone et radicaux libres.....	65
4. L'actinomycine D (LIOVAC*).....	67
4.1. Actinomycine D et radicaux libres.....	67
5. La bléomycine (BLEOMYCINE*) .....	68
5.1. Cytotoxicité de la bléomycine et radicaux libres .....	69
5.1.1. Fixation bléomycine-ADN .....	70
5.1.2. Formation du complexe bléomycine-Fer .....	70
5.1.3. Activation du complexe bléomycine-fer et dégradation de l'ADN.....	70
5.2. Toxicité pulmonaire de la bléomycine et radicaux libres .....	74
5.2.1. Peroxydation lipidique .....	74



5.2.2. La bléomycine hydrolase.....	75
5.2.3. Protection par des agents anti-oxydants .....	76
5.2.3.1. L'α-tocophérol ou vitamine E.....	76
5.2.3.2. Le diméthylsulfoxyde.....	76
5.2.3.3. La N-acétyl-cystéine.....	76
5.2.3.4. La déferoxamine.....	77
6. L'étoposide ou VP16 (VEPESID*) .....	78
6.1. Etoposide et radicaux libres .....	79
7. L'elliptinium (CELIPTIUM*) .....	81
7.1. Elliptinium et production de radicaux libres .....	82
7.2. Toxicité rénale de l'elliptinium et radicaux libres .....	83
8. Le cisplatine (CIPLATYL*) .....	84
8.1. Toxicité rénale du cisplatine et radicaux libres .....	84
9. La procarbazine (NATULAN*) .....	86
9.1. Procarbazine et radicaux libres .....	86
10. La chlorméthine (CARYOLYSINE*).....	87
10.1. Chlorméthine et radicaux libres .....	88
11. La néocarzinostatine.....	88
11.1. Néocarzinostatine et radicaux libres .....	89

<b>CHAPITRE IV:MODIFICATIONS PROTEIQUES INDUITES PAR LES AGENTS ANTICANCEREUX.....</b>	<b>90</b>
1.L'hème oxygénase .....	90
2. Les protéines du choc thermique.....	91
2.1. Protéines du choc thermique et stress oxydatif.....	91
2.2. Protéines du choc thermique et agents anticancéreux.....	92
3. La glycoprotéine P .....	93
4. Glutathion et enzymes dépendantes du glutathion.....	94
4.1. Glutathion et enzymes dépendantes du glutathion et les agents alkylants .....	95
4.2. Glutathion et enzymes dépendantes du glutathion et les anthracyclines.....	97
5. Glycophorine A.....	98
6. Superoxyde dismutase.....	99
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>100</b>
<i>Bibliographie.....</i>	<i>102</i>

# INTRODUCTION

La chimiothérapie a beaucoup progressé depuis son introduction dans la thérapeutique anticancéreuse. Par rapport à la radiothérapie et à la chirurgie qui constituent des traitements locaux, elle offre l'avantage de posséder une action générale, ce qui permet de traiter un cancer disséminé dans l'organisme. Mais elle se caractérise aussi par une faible sélectivité associée à une toxicité notable.

De nombreuses recherches ont été menées afin d'augmenter le rapport bénéfice/risque avec notamment 1./ le développement de modèles expérimentaux d'étude de l'efficacité et de la toxicité de ces molécules, 2./ la définition de modalités d'association d'agents anticancéreux (polychimiothérapie), 3./ l'étude de modalités particulières d'administration (voie, débit) et 4./ l'étude pharmacocinétique, avec la caractérisation des métabolites essentiels et l'étude de leur rôle dans l'efficacité et la toxicité d'une molécule donnée. Un axe de recherche qui prend de l'importance et concerne le mécanisme d'action ou les effets indésirables de certains agents anticancéreux prend en compte la production, au cours de leur métabolisme, de substances radicalaires qui en dérivent ainsi que de radicaux libres oxygénés dont elles stimuleraient la production.

La première partie de notre travail est subdivisée en deux chapitres, qui constituent des mises au point succinctes sur la chimiothérapie d'une part, et sur l'importance des radicaux libres oxygénés en biologie d'autre part.

Dans la seconde partie, consacrée aux radicaux libres produits lors de l'utilisation des médicaments anticancéreux et à certains de leurs effets, nous étudierons au chapitre III de cette partie les agents utilisés en chimiothérapie pouvant induire la formation des radicaux libres soit spontanément, soit après leur activation métabolique. Les modifications biochimiques ainsi causées par ces médicaments semblent surtout associées aux mécanismes cytotoxiques responsables de leur efficacité antitumorale bénéfique, même si on les relie aussi à certains effets indésirables surtout observés pour de fortes doses.

Le quatrième et dernier chapitre est consacré aux modifications induites par les agents anticancéreux sur certaines protéines, plus particulièrement par l'intermédiaire d'une stimulation du stress oxydatif déclenché par les métabolites radicalaires. De telles altérations qualitatives ou quantitatives semblent souvent liées à certains mécanismes de résistance aux agents anticancéreux ou de défense de l'organisme.

## Première Partie :

# GENERALITES SUR LES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX ET LES RADICAUX LIBRES

## CHAPITRE I: LA CHIMIOThERAPIE ANTICANCEREUSE

La chimiothérapie est née en 1943, après la constatation de pancytopénie et d'atrophie lymphoïde causées par les moutardes chez l'animal et chez l'homme et elle est maintenant largement utilisée en thérapeutique anticancéreuse.

Ainsi, la seule chimiothérapie permet notamment le traitement curatif des leucémies aiguës, des lymphomes, des cancers du testicule et des tumeurs embryonnaires et contribue à la guérison des cancers du sein, des adénocarcinomes ovariens, des cancers épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures et des ostéosarcomes (1).  
Actuellement, plus de cinquante agents anticancéreux sont utilisés en cancérologie.

### 1. Principes généraux

#### 1.1. Caractéristiques cinétiques des cellules et des tissus cancéreux

La cellule eucaryote se divise selon un cycle cellulaire comprenant essentiellement deux périodes actives et une période de repos (2, 7).

##### Période active (quatre phases):

-phase G1: c'est la phase la plus longue et aussi la plus variable.

Tous les métabolismes cellulaires s'effectuent, à l'exclusion de la réplication de l'ADN. C'est sur cette phase que les signaux activateurs (facteurs de croissance) ou inhibiteurs de la division cellulaire agissent.

-phase S2: période de synthèse de l'ADN.

-phase G2: phase de repos prémitotique où l'appareil énergétique et mécanique nécessaire à la mitose est mis en place.

-phase M: phase la plus brève et la plus constante, durant laquelle la mitose se produit.

Période de repos:

-phase G0: certaines cellules restent en phase G1, sans se diviser. Ce sont des cellules quiescentes ou en G0, jusqu'à ce qu'un stimulus les fasse à nouveau rentrer dans le cycle. Chez l'homme, où l'étude des stades précoces est par définition impossible, la croissance tumorale se ralentit au fur et à mesure que le volume tumoral augmente. Le temps de doublement varie de sept jours à plusieurs années, en moyenne deux à trois mois (1).

## **1.2. Chimiothérapie et cycle cellulaire**

En fonction de leur action sur le cycle cellulaire, les anticancéreux peuvent être classés en 3 principaux groupes (2):

-médicaments indépendants du cycle:

Assimilables à de véritables radiomimétiques, ils agissent dans ou hors du cycle.

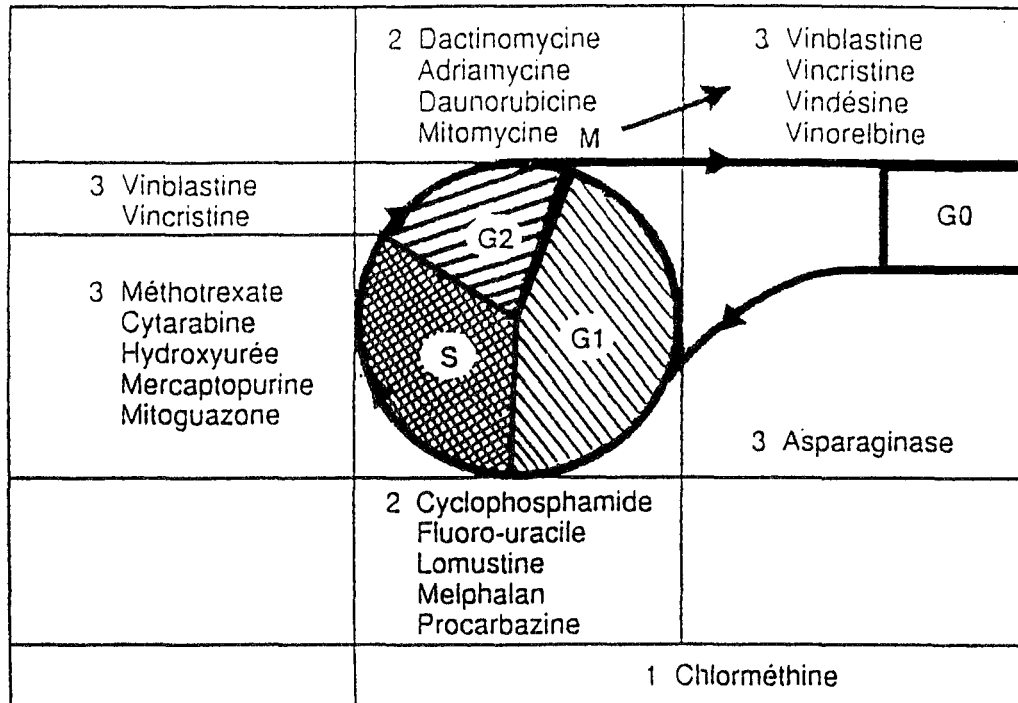
-médicaments dépendants du cycle:

Ils sont actifs sur toutes les cellules qui sont dans le cycle, et sont actifs sur plusieurs phases du cycle.

-médicaments dépendants des phases:

Ils n'agissent que sur des cellules se trouvant à une phase donnée du cycle.

**Figure 1:** Action des principaux agents anticancéreux au niveau du cycle cellulaire.  
D'après Chauvergne et coll. (2).



Hors cycle – G0 : cellule quiescente

Cycle cellulaire { G1 : phase postmitotique  
S : synthèse d'ADN  
G2 : phase prémitotique  
M : mitose

Drogues 1 cycle-indépendantes

2 cycle-dépendantes (phase -indépendantes)

3 phase-dépendantes

## 2. Mécanismes généraux d'action des cytostatiques

La grande majorité des médicaments anticancéreux, à l'exception des médicaments à activité hormonale ou antihormonale et de quelques molécules cytotoxiques par inhibition d'une activité métabolique, va exercer son action cytotoxique sur les cellules cancéreuses par interaction directe ou indirecte avec l'ADN, ou avec l'ARN ou encore avec la synthèse des protéines (1).

## **2.1. Interaction directe avec l'ADN**

Les molécules en cause exercent principalement leur action sur des cellules en phase de synthèse de l'ADN. Elles sont également actives sur des cellules en phase G1, leur action n'est donc qu'incomplètement phase-dépendante (4).

### **2.2.1. Les agents alkylants**

Un agent alkylant est capable de remplacer un proton d'une autre molécule par un radical alkyl (noté R-CH<sub>2</sub> -). Il forme ainsi une liaison covalente avec les acides nucléiques et crée sur l'ADN soit une cassure monocaténaire (pour les alkylants mono-fonctionnels), soit un pont intra ou intercaténaire (pour les alkylants bi-fonctionnels, qui possèdent deux groupes réactifs) (7). Les centres nucléophiles interagissant avec les alkylants sont situés sur les molécules de l'ADN et plus précisément sur les trois bases guanine, adénine, cytosine. 90% de l'alkylation aurait lieu sur l'azote en 7 de la guanine, et une proportion plus faible sur l'oxygène en 6, cette position opposée étant impliquée dans la formation d'une liaison hydrogène avec la cystine du brin opposé (3). La liaison est irréversible et ne peut être éliminée que par un mécanisme comportant une excision de la liaison, ce processus étant à l'origine de l'effet cytotoxique, mutagène et carcinogène (7).

Les autres substrats biologiques pouvant subir une alkylation sont l'eau, les ions chlorures, les groupes carbonyles, hydroxyles et thiols, les amines et les ions phosphates (1).

Les agents alkylants sont actuellement subdivisés en plusieurs classes en fonction de leur structure chimique et de leur modalité d'action:

-les moutardes à l'azote:

La chlorméthine (CARYOLYSINE\*), le melphalan (ALKERAN\*), le chlorambucil (CHLORAMINOPHENE\*).

-les oxazophorines:

Elles appartiennent au groupe des moutardes à l'azote, mais présentent une toxicité locale moindre que la chlorméthine (8).

Il s'agit du cyclophosphamide (ENDOXAN\*) et de l'ifosfamide (HOLOXAN\*).

-les éthylènes-imines:

Deux médicaments appartiennent à ce groupe, le thiotépa (THIOTEPA\*), très peu utilisé et l'altrétamine (HEXASTAT\*).

-les alkyls sulfonates:

Seul le busulfan (MISULBAN\*) est utilisé.

L'action cytotoxique s'exerce uniquement sur les cellules hématopoïétiques (1).

-les nitroso-urées:

Représentés par carmustine (BICNU\*), lomustine (BELUSTINE\*) et streptozotocine (ZANOZAR\*).

-les triazènes:

Dacarbazine (DETICENE\*) et procarbazine (NATULAN\*).

-les organoplatines:

Cis-platine (CIS-PLATYL\*) et carboplatine (PARAPLATINE\*).

-la mitomycine C (AMETYCINE\*)

### 2.1.2. Les agents intercalants

Ce sont des molécules polycycliques coplanaires capables de se "glisser" entre deux paires de bases adjacentes de la double hélice d'ADN. En l'absence de stabilisation par une liaison externe à un désoxyribose ou à un groupement phosphate, il s'agit d'une liaison réversible (1). Si l'intercalation entraîne une inhibition des synthèses d'ADN, d'ARN et des protéines, elle ne peut par elle-même entraîner des cassures de la molécule d'ADN, le mécanisme le mieux étayé étant l'activation de la topoisomérase II par formation d'un complexe ternaire médicament-enzyme-ADN (4).

Les agents intercalants comprennent cinq familles de molécules:

-les anthracyclines:

Doxorubicine ou adriamycine (ADRIBLASTINE\*), daunorubicine (CERUBIDINE\*), épirubicine (FARMORUBICINE\*), zorubicine (RUBIDAZONE\*), aclarubicine (ACLACYNOMYCINE\*) et idarubicine (ZAVEDOS\*).

-les amino-anthraquinones ou anthracènediones:

De structure proche des anthracyclines, seul la mitoxantrone (NOVANTRONE\*) est disponible.

-les acridines:

L'amsacrine (AMSIDINE\*) est la seule molécule active utilisée.

-les ellipticines:

Acétate d'elliptinium (CELLIPTIUM\*)

-les anthraquinones:

La mitoxantrone (NOVANTRONE\*)

-les actinomycines:

L'actinomycine D ou dactinomycine (LIOVAC\*)

### **2.1.3. Les agents scindants**

Certains agents cytotoxiques forment des complexes stables avec l'ADN, responsables de cassures de celui-ci. Ce mode d'action est caractéristique de la bléomycine (BLEOMYCINE\*), qui induit des cassures de simples et doubles brins d'ADN par la formation d'espèces réactives oxygénées.

### **2.1.4. Les agents produisant des radicaux libres**

Certains agents anticancéreux entraînent la production de radicaux libres responsables de dommages à l'ADN, aux membranes lipidiques et aux protéines. Ce mécanisme d'action sera développé au cours de la troisième partie de notre travail.

## **2.2. Interaction indirecte avec l'ADN**

### **2.2.1. Les antimétabolites**

Ils interfèrent avec une ou plusieurs étapes enzymatiques essentielles à la synthèse de l'ADN et exercent leur action du fait de leur parenté structurelle avec les intermédiaires physiologiques (coenzymes ou métabolites). Ils sont actifs pendant la synthèse de l'ADN (5).

-les antifoliques:

Le méthotrexate (LEDERTREXATE\*) est un analogue de structure de l'acide folique et il agit essentiellement par inhibition directe de la dihydrofolate réductase, il provoque un arrêt de la synthèse de l'ADN, et un blocage secondaire des synthèses d'ARN et des protéines (4).

-les analogues des pyrimidines:

La cytarabine (ARACYTINE\*, CITARABEL\*) est un stéréoisomère de synthèse d'un nucléoside pyrimidique, la cytidine dont elle diffère par la présence d'arabinose au lieu



du ribose, lui permettant de se comporter comme un analogue de la désoxy-2'-cytidine (4).

Le 5-fluorouracile (FLUOROURACILE\*), dont l'activation métabolique aboutit à la formation d'un nucléotide actif, la 5-fluorodéoxyuridine monophosphate (FUDMP), qui inhibe la thymidilate synthétase (3).

-les analogues des purines:

La mercaptopurine(PURINETHOL\*) et la thioguanine (LANVIS\*) qui agissent par inhibition de la biosynthèse de novo des bases puriques et/ou par incorporation dans l'ADN (5).

### 2.2.2. Les inhibiteurs de la formation des tubulines

-les alcaloïdes de la pervenche:

Ils agissent en se fixant sur certains récepteurs de la tubuline, empêchant sa polymérisation et entraînant alors un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (3).

La vinblastine (VELBE\*) et la vincristine (ONCOVIN\*) sont extraites de *Vinca Rosea*.

La vindésine (ELDESINE\*) et la vinorélbine (NAVELBINE\*) sont obtenus par hémisynthèse.

-les épipodophyllotoxine:

Ce sont deux dérivés hémisynthétiques des podophyllotoxines, substances naturelles isolées de *Podophyllum peltatum*.

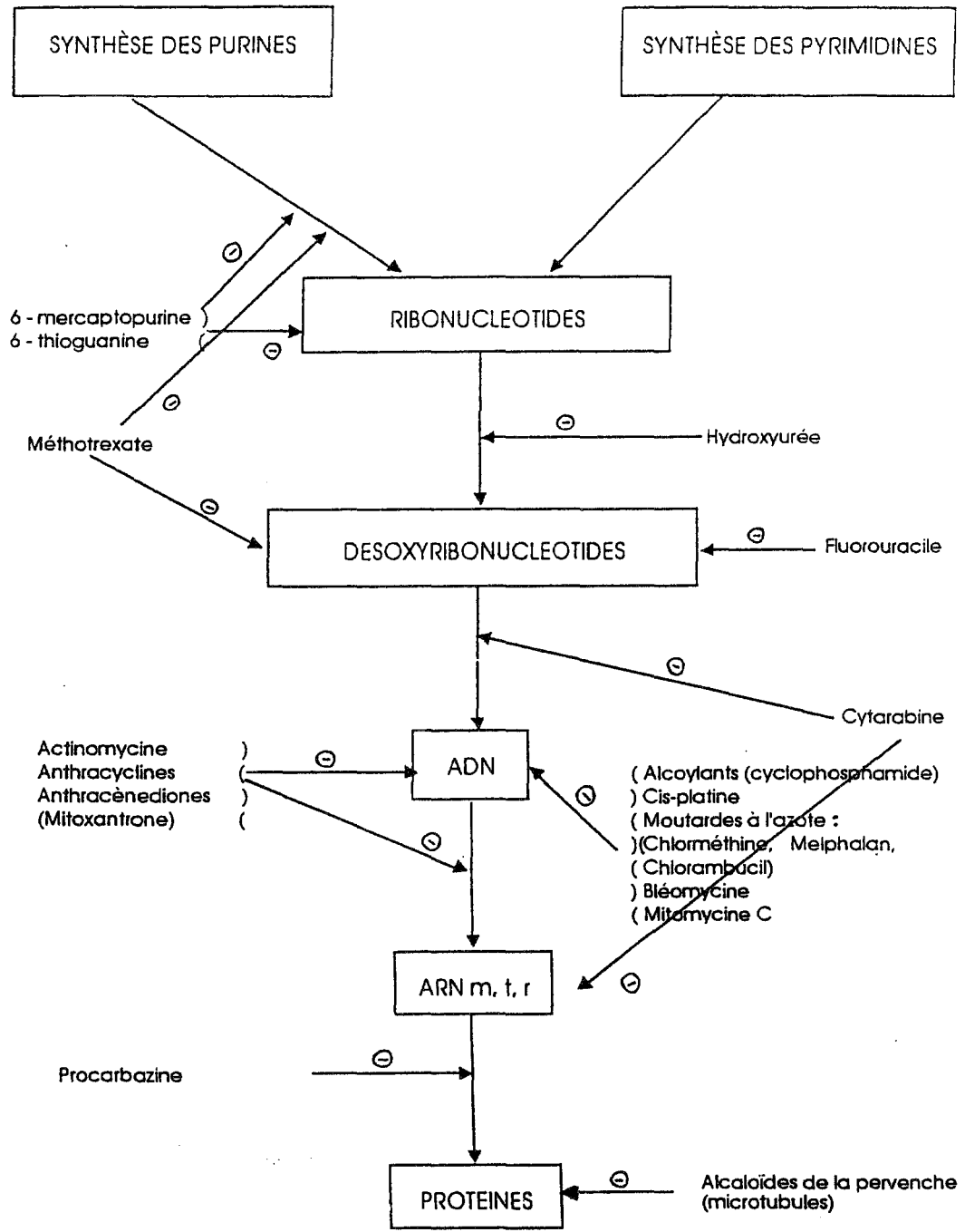
L'étoposide ou VP16 (VEPESIDE) et le téniposide (VM26) quoiqu'agents tubulo-affins n'inhibent pas l'assemblage des microtubules mais induisent un retard de la progression en phase S.

### 2.2.3. Les inhibiteurs de la topoisomérase II

Plusieurs agents anticancéreux induisent des cassures de l'ADN, en se liant à une protéine, la topoisomérase II, une enzyme capable de modifier la topologie de l'ADN en coupant et refermant les deux chaînes d'une molécule d'ADN, permettant le passage d'une autre molécule d'ADN au travers de la première pendant la phase d'ouverture (4).

La liaison de l'anticancéreux avec l'enzyme empêche la réparation des cassures avec l'ADN, il s'agit souvent d'un mode d'action complémentaire, le plus souvent d'une liaison intercalative avec l'ADN pour les anthracyclines, les acridines, la mitoxantrone les ellipticines. Les épipodophyllotoxines agissent aussi par liaison avec la topoisomérase- II.

**Figure 2:** Sites d'action des principaux médicaments anticancéreux. D'après Marty et coll. (1)



### **3. Toxicité des agents anticancéreux**

La toxicité cellulaire par laquelle se manifestent les effets antitumoraux de la chimiothérapie n'étant pas spécifique des tissus cancéreux, toute administration de médicaments anticancéreux sera accompagnée de manifestations liées à l'atteinte concomitante des tissus sains de l'organisme (6).

#### **3.1. Toxicité sur la moelle osseuse**

Les lignées hématopoïétiques ayant un coefficient de renouvellement cellulaire élevé sont plus vulnérables à l'action toxique des anticancéreux ce qui confirme le caractère radiomimétique de la plupart de ces médicaments, et évoque la célèbre loi de Bergonie et Tribondeau concernant la nocivité des rayons X. A des degrés divers (intensité et précocité de la leucopénie et de la thrombopénie) et à de rares exceptions près (bléomycine), tous les médicaments utilisés sont médullotoxiques et le retentissement hématologique, qui est parfois cumulatif, constitue le plus lourd handicap de la chimiothérapie (1).

#### **3.2 Toxicité digestive**

Très fréquente, la toxicité digestive est l'une des toxicités subjectivement la plus mal perçue par le malade.

-effet émétisant: par stimulation du centre du vomissement (zone réticulée), il est observé avec tous les anticancéreux, en particulier avec le cisplatine, les moutardes à l'azote, la mitomycine C et les nitroso-urées (8).

-atteinte des muqueuses: le mécanisme des atteintes des muqueuses ou mucites, avant tout bucco-pharyngées induit par les agents anticancéreux est la destruction de l'épithélium buccal et l'inhibition de sa repopulation par l'agent circulant ou ses métabolites salivaires. Ceci est observé de manière pure avec le méthotrexate, le fluorouracile, la cytarabine et les vinca-alcaloïdes (8).

-diarrhées: les diarrhées sont fréquentes et observées dans 5 à 10% des traitements anti-cancéreux. Elle surviennent par effet stimulant du péristaltisme (notamment avec le cis-platine et la dacarbazine), ou par atteinte de la muqueuse avec le 5-fluoro-uracile (1).

### **3.3. Toxicité cutanée et des phanères**

Comme dans le cas des rayonnements ionisants, l'alopecie survient par atteinte du follicule pileux notamment avec les anthracyclines, le cyclophosphamide, les nitroso-urées et le 5-fluoro-uracile, elle est presque toujours réversible (8). En outre, certains agents peuvent être responsables d'une toxicité cutanée, à type d'hyperpigmentation ou de mélanodermie, incomplètement réversibles. Ce sont la bléomycine, le busulfan et le cyclophosphamide (1). Enfin, des exanthèmes prurigineux, de mécanisme immuno-allergique sont observés notamment avec la procarbazine (8).

### **3.4. Toxicité hépatique**

La toxicité hépatique est prouvée pour des agents tels que la chlormétine, le méthotrexate, la dacarbazine et les nitroso-urées (8). Les atteintes hépatiques observées peuvent aller de la simple élévation transitoire des transaminases, à des foyers de nécroses cellulaires et à la cirrhose hépatique.

### **3.5. Toxicité rénale**

Les deux agents induisant des néphrotoxicités aiguës sont le méthotrexate et le cisplatine (5). De plus, la mitomycine C peut être responsable d'une microangiopathie thrombotique avec insuffisance rénale (1). La streptozocine est néphrotoxique chez 25 à 40 % des sujets traités pouvant évoluer de manière autonome vers l'atrophie rénale, puis l'insuffisance rénale chronique (8). Enfin, l'elliptinium présente une néphrotoxicité qui semble être cumulative (5).

### **3.6. Toxicité vésicale**

Le cyclophosphamide et l'ifosfamide entraînent une nécrose tubulaire aiguë, mais l'effet secondaire majeur de ces produits est la cystite hémorragique. Elle est dose-dépendante et peut aboutir à une fibrose de la vessie (10).

### **3.7. Toxicité pulmonaire**

Elle est rarement observée, le principal médicament impliqué dans la survenue de fibroses pulmonaires étant la bléomycine. Le méthotrexate, le busulfan et la carmustine

peuvent être aussi responsables d'une fibrose pulmonaire mais avec une faible incidence (1).

### **3.8. Toxicité cardiaque**

Une toxicité cardiaque cumulative existe avec les anthracyclines ( sujet développé dans le chapitre correspondant). La mitoxantrone présente une cardiotoxicité moins importante. Quelques observations isolées d'atteintes cardiaques ont été rapportées pour le cyclophosphamide à forte dose, ainsi que pour les alcaloïdes de la pervenche (1). De plus, le 5-fluoro-uracile à forte dose unitaire est responsable de nécroses myocardiques aiguës mais dans moins de 0.1% des administrations (9).

### **3.9. Toxicité neurologique**

Les alcaloïdes de la pervenche (vincristine, vindésine et vinblastine, par ordre décroissant de nocivité), induisent une neurotoxicité centrale et périphérique avec paresthésie, abolition des réflexes tendineux, encéphalopathie et troubles moteurs (5). Les autres médicaments neurotoxiques sont le 5-fluorouracile, la cytarabine, la procarbazine et le méthotrexate (1). La neurotoxicité du cisplatine est périphérique, dose-dépendante et irréversible, apparaissant principalement sous forme d'une ototoxicité cochléaire (8).

### **3.10. Toxicité sur les cellules germinales**

Les médicaments anti-cancéreux et tout particulièrement les agents alkylants plus que les anthracyclines ou les anti-métabolites peuvent affecter la fonction gonadique (1). Ainsi, chez l'homme, une oligo-azoospermie souvent définitive peut-être induite par ces médicaments. De même chez la femme, les polychimiothérapies sont, en règle générale, responsables d'aménorrhée et d'un tableau biologique de ménopause.

**Figure 3:** Toxicité des agents anticancéreux en fonction des organes ou des tissus. D'après Powis et coll. (8).

<b>ORGANE-CIBLE</b>	<b>MEDICAMENT</b>
Coeur	doxorubicine, daunorubicine
Rein	cisplatine, méthotrexate, streptozocine
Système nerveux périphérique	vincristine, cisplatine
Système nerveux central	procarbazine, 5-fluoro-uracile, mitomycine C, méthotrexate
Système auditif	cisplatine
Tractus digestif - nausées et vomissements  - mucosite - diarrhée	la plupart des agents, mais plus particulièrement cisplatine, moutardes à l'azote, mitomycine C, nitroso-urées méthotrexate, 5-fluoro-uracile, vinca-alcaloïdes vincristine, 5-fluoro-uracile
Foie	méthotrexate, dacarbazine, nitroso-urées
Vessie	cyclophosphamide, ifosfamide
Poumon	bléomycine, busulfan, carmustine, méthotrexate
Testicules	agents alkylants
Ovaire	busulfan, chlorambucil, cyclophosphamide, vinblastine
Foetus (Tératogénéicité)	méthotrexate, 6-mercaptopurine
Os	méthotrexate
Moëlle osseuse	la plupart des agents sauf vincristine, bléomycine, cisplatine
Peau et vaisseaux sanguins - alopecie  - phlébite  - hypersensibilité - hyperpigmentation/photosensibilisation	doxorubicine, cyclophosphamide, nitroso-urées, 5-fluoro-uracile moutardes à l'azote, anthracyclines, actinomycine D, vinblastine, mitomycine C cisplatine, procarbazine busulfan, anthracyclines, actinomycine D, 5-fluoro-uracile, méthotrexate, bléomycine

# CHAPITRE II : LES RADICAUX LIBRES OXYGENES

## 1. Définition des radicaux libres

La stabilité d'un composé chimique, (atome, molécule, ion) est liée à l'organisation de la couche d'électrons qui sont situés sur son orbitale externe et dans un composé stable, les électrons sont tous appariés (11). Dans une molécule, la liaison entre deux atomes s'effectue par mise en commun d'électrons à spins anti-parallèles par apport d'énergie, (lumineuse, thermique ou surtout chimique) (12). Mais le couple électronique peut-être rompu avec formation d'atomes, groupe d'atomes ou molécules possédant un électron non apparié (célibataire) sur l'orbitale externe, et défini comme un radical libre (13).

Ainsi, la formation de radicaux libres résulte d'une rupture homolytique par opposition à la rupture hétérolytique d'une liaison ionique (13).

La durée de vie des radicaux libres est très courte et la recherche avide d'électrons pour réappairier leurs électrons célibataires fait de ces espèces chimiques de redoutables agresseurs potentiels à l'égard des molécules biologiques (14). Ils peuvent se combiner avec d'autres radicaux libres, ou agir sur des molécules par des processus d'arrachement ou de fragmentation susceptibles d'être à l'origine de réactions en chaîne (13).

## 2. Les différents radicaux libres dérivés de l'oxygène

Du fait de sa structure chimique (deux atomes d'oxygène ayant mis en commun deux électrons de même spin et de même niveau d'énergie), l'oxygène moléculaire est une molécule assez stable, peu réactive en l'absence de métaux de transition ou de molécules en contenant, les uns et les autres étant ubiquitaires dans la biosphère. Cette réactivité limitée est liée à l'intensité de la force de liaison entre les deux atomes d'oxygène (15). Cependant, dans certaines conditions métaboliques, lors de réactions enzymatiques ou non, l'oxygène moléculaire peut conduire à la formation de radicaux libres: les radicaux libres oxygénés (13).

Ces radicaux libres oxygénés sont de différents types et possèdent des réactivités différentes.

### **2.1. L'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)**

Il résulte de l'acceptation d'un électron par une molécule d'oxygène à l'état fondamental. Moyennant un apport d'énergie ou la présence d'un catalyseur, l'oxygène peut apparier un de ses électrons libres, acquérir une charge négative et produire l'anion superoxyde.



La durée de vie du radical superoxyde est de l'ordre de 10<sup>-2</sup> seconde (14). In vivo, ce sont les superoxyde dismutases (SOD) qui le dismutent en oxygène et en peroxyde d'hydrogène.

### **2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

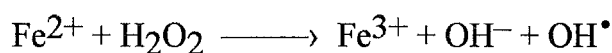
Le peroxyde d'hydrogène ne peut pas être considéré comme un radical, puisqu'il ne possède pas d'électron célibataire et est stable (12). Cependant, sa toxicité découle de son pouvoir oxydant et de sa capacité à produire des radicaux libres oxygénés tels que le radical hydroxyle et l'anion superoxyde. La catalase est capable de détruire le peroxyde d'hydrogène.

### **2.3. Le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)**

Le radical hydroxyle est une espèce radicalaire extrêmement réactive (durée de vie de l'ordre de 10<sup>-6</sup> seconde) et très toxique, capable d'attaquer les structures organiques les plus stables avec une constante de vitesse extrêmement élevée (12,14). Le radical hydroxyle est formé:

-Lors de la réduction du peroxyde d'hydrogène par des métaux de transition, des traces de fer ferreux Fe(II), ou de cuivre Cu(II), pouvant ainsi entraîner la formation du radical hydroxyle par réduction du peroxyde d'hydrogène.

C'est la "**réaction de Fenton**" (12,14):

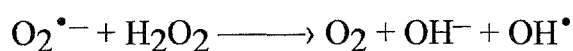
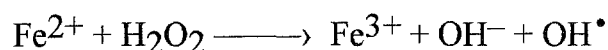
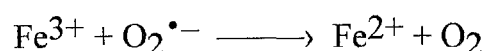




-A partir du radical anion superoxyde:

L'anion superoxyde peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène, en présence de métaux de transition, tel que le fer ou le cuivre, pour produire le radical hydroxyle.

C'est la réaction **d'Haber-Weiss** (12,14):



Il n'existe pas d'enzymes détruisant spécifiquement le radical hydroxyle. Le principal moyen de lutte contre ce radical est d'éviter sa formation par l'action de systèmes enzymatiques agissant sur ses précurseurs, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, ( sujet développé ultérieurement).

#### **2.4. Les radicaux alcoxy (RO<sup>•</sup>) et peroxy (ROO<sup>•</sup>)**

Ils peuvent être produits par l'action d'un radical libre oxygéné sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés. Les radicaux peroxy et alcoxy sont moins réactifs mais plus sélectifs que les radicaux hydroxyle et ils permettent la propagation de la réaction en chaîne lors de la peroxydation lipidique (11).

#### **2.5. L'oxygène singulet (1O<sub>2</sub><sup>\*</sup>)**

Un apport d'énergie (chaleur, rayonnement UV, rayonnement gamma) peut faire passer l'oxygène de son état naturel initial à un état singulet caractérisé par une durée de vie très courte (10<sup>-6</sup> seconde) (16). L'oxygène peut-être dans deux états singulets différents:

- soit les électrons sont anti-parallèles mais ne sont pas sur le même niveau d'énergie.

- soit les électrons sont antiparallèles et tournent sur le même niveau d'énergie.

## **2.6. Le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>)**

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique est une radical libre dont la synthèse dépend de la NO-synthase qui catalyse sa production et celle de la L-citrulline à partir de la L-arginine (17). Le monoxyde d'azote est à la fois un puissant hypotenseur, un médiateur de l'inflammation, un neuromédiateur et un cytoprotecteur au niveau central à faible dose; mais il possède des propriétés cytotoxiques à forte dose.

## **3. Production de radicaux libres au cours du métabolisme cellulaire normal**

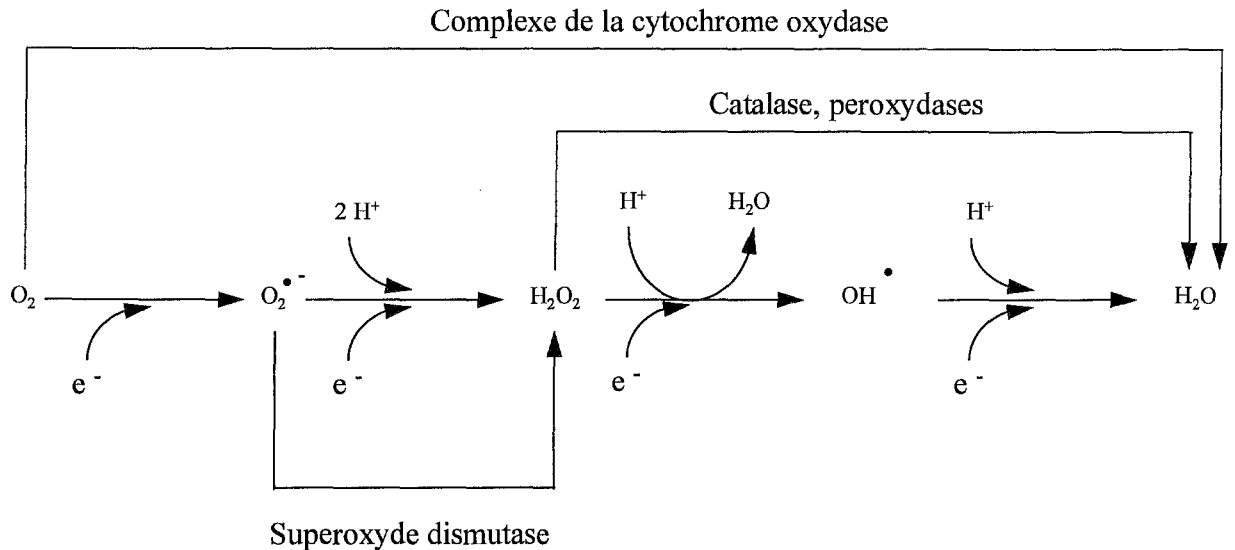
Dans les conditions physiologiques, la production de radicaux libres semble être permanente et est contrôlée par un puissant matériel de défense cellulaire, ce qui permet aux cellules et aux tissus de conserver leur intégrité structurale et fonctionnelle. L'essentiel de la production radicalaire s'effectue durant le métabolisme cellulaire de l'oxygène et pendant les réactions d'oxydo-réduction.

### **3.1. Production au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie**

Au cours de la respiration cellulaire, l'oxydation de l'acétyl CoA dans le cycle de Krebs libère des électrons, agissant simultanément avec l'oxygène moléculaire et les protons pour former de l'eau. Cette réduction directe, (c'est à dire en une seule étape) de l'oxygène moléculaire, au niveau de la chaîne mitochondriale, se fait par la voie de la cytochrome oxydase (CO), aboutissant à la production d'ATP, et de l'eau (11,15). Dans cette réaction, les électrons sont déplacés par paire, empêchant ainsi tous les stades intermédiaires de la réduction de l'oxygène, et par conséquent, la production de radicaux libres (11,14).

Cependant, 1 à 5% de l'oxygène moléculaire subit une réduction progressive, c'est à dire fait l'objet d'une réduction monovalente, ou monoélectronique, aboutissant à la formation de radicaux libres intermédiaires (11,14). Le site de l'ubiquinone-cytochrome b semble être le site majeur de production d'anion superoxyde, qui serait due à l'autooxydation de l'ubisemiquinone. La NADH déshydrogénase est aussi responsable d'une production d'anion superoxyde (15).

**Figure 4:** Schématisation des voies de réduction intracellulaire de l'oxygène moléculaire, la voie de la cytochrome oxydase et la voie univalente avec les défenses enzymatiques. D'après Clavel et coll. (14).



### **3.2. Production au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire**

Les monooxygénases ou oxydases à fonction mixte catalysent notamment des réactions au cours desquelles un des atomes de l'oxygène est incorporé dans un substrat organique, l'autre étant réduit en eau, ces réactions impliquant des transferts monoélectroniques (18). Les cytochromes P-450 sont des hémoprotéines qui font partie de ce groupe d'enzymes et sont habituellement présents dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse et dans la membrane nucléaire. Ils catalysent, en particulier, des réactions d'hydroxylation dans lesquelles un substrat organique RH est hydroxylé en R-OH au dépens d'un atome de l'oxygène moléculaire, l'autre atome étant réduit en eau.

Les cytochromes P-450 sont importants dans l'hydroxylation de nombreux médicaments et de substances étrangères au corps (xénobiotiques), particulièrement si ils sont hydrophobes, ce qui les rend plus solubles dans l'eau et favorise leur excrétion dans les urines. Par contre, l'hydroxylation de certains composés les transforme en substances toxiques, voire carcinogènes, dévoyant ainsi la fonction de détoxification.

Les cytochromes P-450 des membranes microsomales et nucléaires peuvent directement former l'anion superoxyde par un transfert monoélectronique à l'oxygène moléculaire, ou former du peroxyde d'hydrogène par dissociation des complexes peroxy-cytochromes (15). De plus, les cytochromes-réductases à flavoprotéine

(NADPH cytochrome P-450 réductases) qui fournissent les électrons aux cytochromes respectifs peuvent subir une autooxydation et former l'anion superoxyde (15).

### **3.3. Production au niveau des membranes plasmiques**

#### **3.3.1. La cyclooxygénase et la lipooxygénase**

Le métabolisme de l'acide arachidonique, au moyen de la cyclooxygénase, pour produire les prostaglandines, et de la lipooxygénase pour produire les leukotriènes implique la formation de composés peroxy intermédiaires, mais aussi de radicaux superoxyde et hydroxyle (12,15). Non seulement la cascade de l'acide arachidonique peut être une source importante d'oxydants toxiques, mais elle peut être aussi initiée par l'attaque de radicaux libres provenant d'autres sources (12).

#### **3.3.2. La NADPH oxydase**

La NADPH oxydase des membranes plasmiques des cellules phagocytaires (neutrophiles, macrophages) est une source importante de radicaux superoxyde (12).

L'enzyme est normalement au repos, mais elle peut être activée, par exemple par les bactéries, les cytokines, et elle catalyse alors la réduction de l'oxygène en anion superoxyde et en peroxyde d'hydrogène. Ce phénomène appelé "explosion respiratoire" est un des mécanismes majeurs par lesquels les phagocytes détruisent les microorganismes.

Le peroxyde d'hydrogène produit est le substrat d'une enzyme présente dans les phagosomes, la myéloperoxydase (MPO), qui catalyse la production d'acide hypochloreux à partir du peroxyde d'hydrogène et d'ions chlorure (12).



L'acide hypochloreux (HOCl) peut réagir avec les amines endogènes pour former des N-chloramines (R-NH-Cl) qui sont des agents oxydants très puissants (12).

### **3.4. Production au niveau des peroxysomes**

Les peroxysomes sont une source potentielle importante de radicaux superoxyde et de peroxyde d'hydrogène, car ils contiennent de nombreuses oxydases. Nous citerons la D-amino-acide oxydase, l'urate oxydase, la L- $\alpha$ -hydroxyacide oxydase (15). Mais des enzymes défensives comme la catalase et la SOD sont également présentes dans les peroxysomes.

### **3.5. Production au niveau du cytosol**

#### **3.5.1. Autooxydation de molécules endogènes**

La réduction univalente de l'oxygène peut-être aussi la conséquence de l'autooxydation de molécules intracellulaires, telles que la ferredoxine, l'hémoglobine, les thiols, les catécholamines et les hydroquinones (15,19).

#### **3.5.2. La xanthine oxydase**

La xanthine oxydase catalyse l'oxydation en deux étapes des purines, comme l'hypoxanthine en xanthine puis en urate. In vivo, l'enzyme existe sous deux formes (12):

- une forme déhydrogénase qui utilise le  $\text{NAD}^+$  comme accepteur d'électrons et qui ne produit pas de radicaux libres.

- une forme oxydase, qui utilise l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons et qui produit ainsi le radical superoxyde lors du métabolisme des purines.

La forme déhydrogénase prédomine dans la plupart des tissus en conditions normales mais elle peut être convertie en la forme oxydase lors de l'ischémie ou lors de l'oxydation de ses groupements sulfhydryls. La xanthine oxydase joue d'ailleurs un rôle clef dans la production de radicaux libres lors du cycle ischémie-reperfusion (12,15).

**Figure 5** : Différentes sources de radicaux superoxydes. D'après Emerit et coll. (11)

---

***1./ Réaction d'autooxydation***

---

Flavines (FADH<sub>2</sub>, FMNH<sub>2</sub>)  
Quinones  
Composés aromatiques nitrés  
Mélanine  
Groupement thiols  
Tétrahydroptéridines

---

***2./ Réactions enzymatiques et protéines***

---

Aldéhyde oxydase  
Cytochrome P450  
Cytochrome b5  
Hémoglobine  
Indolamine dioxygénase  
NADH-Cytochrome b5 réductase  
NADPH-Cytochrome P450 réductase  
Peroxydases  
Tryptophane dioxygénase  
Xanthine oxydase

---

***3./Origines cellulaires***

---

Chaine respiratoire mitochondriale et microsomiale  
Photosystème des chloroplastes  
Leucocytes et macrophages lors de la phagocytose

## **4. Production de radicaux libres liée aux facteurs environnementaux**

Les rayons X, gamma, ultra-violets, en agissant sur les électrons répartis sur les différentes orbitales autour du noyau engendrent lors de leurs interactions avec différents composés cellulaires et notamment avec l'eau, la formation de radicaux libres. Ce processus explique en partie l'action mutagène des radiations ionisantes.

De nombreuses substances exogènes sont susceptibles de se transformer en espèces radicalaires et de produire ensuite par réaction avec l'oxygène moléculaire des radicaux libres oxygénés, via leur réduction monoélectronique par différents systèmes enzymatiques (NADPH cytochrome P450 réductase, NADH cytochrome b<sub>5</sub> réductase, NADH déhydrogénase, ferredoxine réductase). Ainsi, la production d'espèces radicalaires serait impliquée (20):

- dans la cytotoxicité et/ou la toxicité de différents agents anticancéreux (confère la troisième partie de notre travail).
- dans la toxicité rénale de la céphaloridine (antibiotique).
- dans la toxicité pulmonaire du paraquat (herbicide) et de la nitrofurantoïne (antibactérien).
- dans la toxicité pancréatique de l'alloxane (inducteur de diabète sur différents animaux).
- dans la toxicité pulmonaire et hépatique du tétrachlorure de carbone (solvant organique).

## **5. Production de radicaux libres en situation pathologique**

La compréhension et le traitement de nombreux processus pathologiques pourraient bénéficier de la connaissance du rôle joué par les radicaux libres oxygénés dans les anomalies membranaires et macromoléculaires. Ainsi, beaucoup de travaux tentent de mettre en évidence une altération des processus de protection et de contrôle des radicaux libres ainsi que les effets de la peroxydation qui en découlent (14).

**Figure 6:** Résumé des données de la littérature. Peroxydation lipidique et pathologie humaine d'après Chouvet (16).

<p><b><i>Affections</i></b></p> <p><b>Troubles vasculaires:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Accidents vasculaires cérébraux</li> <li>*Angiopathie diabétique ou associée à une hyperlipidémie</li> <li>*Claudication intermittente</li> <li>*Infarctus du myocarde</li> </ul> <p><b>Troubles hématologiques:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Anémie hémolytique du nouveau né</li> <li>*Maladies myéoprolifératives</li> </ul> <p><b>Troubles rhumathologiques:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Arthroses et arthrites</li> </ul> <p><b>Atteinte hépatique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Affections diverses</li> <li>*Halothane</li> <li>*CCl<sub>4</sub></li> <li>*Alcoolisme</li> </ul> <p><b>Troubles neurologiques:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Lipofuscine cérébrale neuronale</li> <li>*Maladie de Duchenne</li> <li>*Trisomie 21</li> <li>*Troubles éventuellement secondaire à une carence en vitamine E</li> <li>*Maladie d'Alzheimer</li> </ul> <p><b>Atteinte pulmonaire:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Dysplasie broncho-pulmonaire</li> <li>*Troubles pulmonaires lors d'oxygénothérapie</li> <li>*Syndrome de détresse respiratoire</li> </ul> <p><b>Autres affections:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*Réactions inflammatoires</li> <li>*Atteinte pancréatique</li> <li>*Maladies graves avec traitement en salle de soins intensifs</li> <li>*Toxémie gravidique</li> <li>*Effets médicamenteux</li> <li>*Surcharge en fer</li> <li>*Intoxication au paraquat</li> <li>*Exposition au plomb</li> <li>*Exposition à l'oxygène</li> <li>*Exposition à l'ozone</li> <li>*Exposition aux UV</li> <li>*Exposition aux radiations ionisantes</li> </ul>
--



## **6. L'agression radicalaire et ses sources biologiques**

La réactivité d'un radical libre oxygéné vis à vis des molécules biologiques se traduit par l'arrachement d'électrons de l'orbitale externe de celle-ci, sous l'effet du champ électrique dû à l'électron célibataire du radical libre (14). L'électron arraché s'apparie avec l'électron célibataire et stabilise ainsi le radical libre, alors que la molécule ayant perdu un électron externe devient à son tour un radical libre agressif, entraînant alors une réaction en chaîne radicalaire (12,14).

Les trois cibles principales des radicaux libres sont:

- les lipides membranaires.
- les protéines.
- les acides nucléiques.

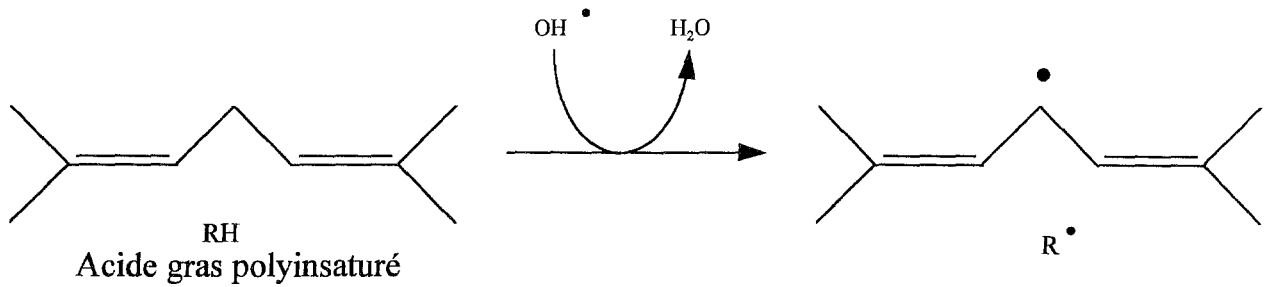
### **6.1. Attaque des lipides membranaires ou peroxydation lipidique**

La peroxydation des phospholipides membranaires s'explique par la forte sensibilité des acides gras polyinsaturés; dûe à leurs liaisons multiples (doubles, triples), vis à vis de l'agression radicalaire. L'attaque radicalaire des membranes cellulaires phospholipidiques semble surtout médiée par le radical hydroxyle et porte sur les membranes plasmiques ainsi que sur celles des organelles.

On admet classiquement que le déroulement de la peroxydation lipidique au niveau des acides gras insaturés peut être divisé en trois phases, initiation, propagation et terminaison que nous détaillons ci-dessous (14).

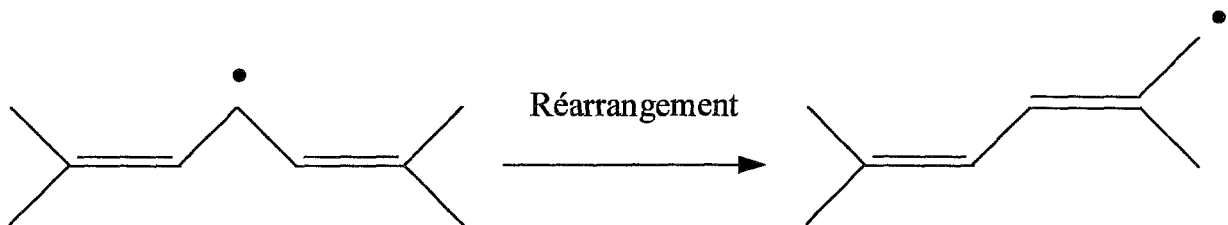
1./Initiation:

L'initiation à lieu au niveau de la double liaison (structure divinyl-méthane) de l'acide gras insaturé. Le radical hydroxyle "arrache" un atome d'hydrogène par rupture homolytique de sa liaison covalente, et se transforme en eau, l'acide gras insaturé devenant un radical libre ( $R^\bullet$ ) (14).

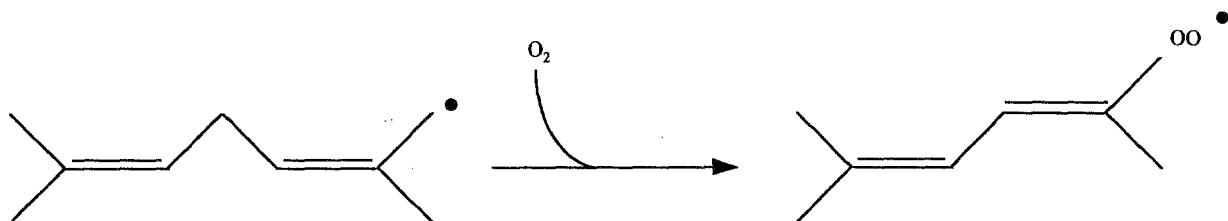
2./Propagation:

Elle se présente en deux sous étapes (11,14):

Le réarrangement des doubles liaisons conduit à la formation d'un système diénique conjugué, permettant d'augmenter la durée de vie du nouveau radical.

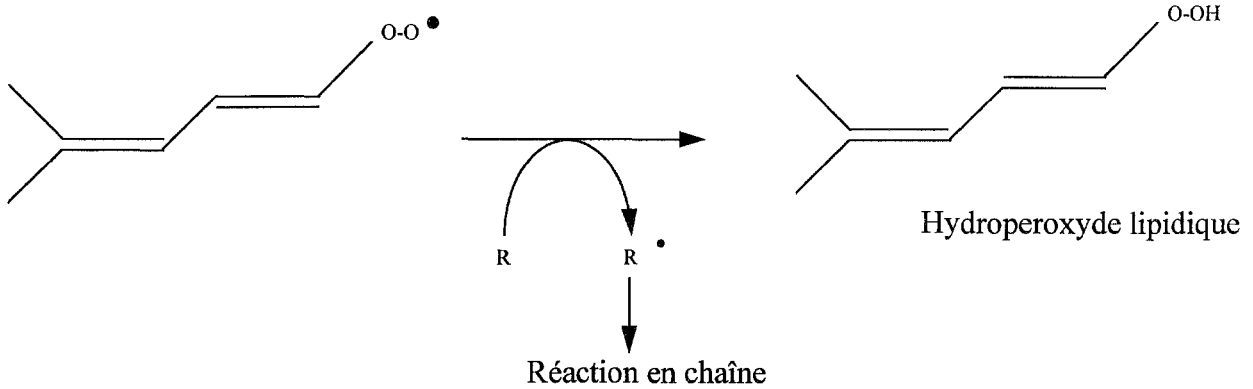


L'oxygène réagit alors sur le carbone radicalaire, pour donner un système radicalaire nouveau, le radical peroxy ( $ROO^\bullet$ ).



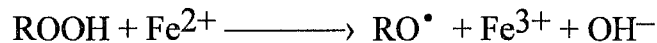
Le radical peroxy arrache un hydrogène sur une nouvelle molécule voisine, insaturée et intacte, et se transforme alors en hydroperoxyde ( $ROOH$ ). Le radical peroxy,

nouvellement formé, peut donc à son tour commencer un nouveau cycle, continuant la réaction en chaîne.

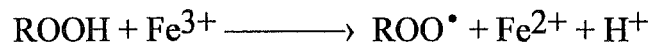


Les hydroperoxides formés sont relativement stables et faiblement réactionnels mais peuvent évoluer de différentes façons:

- ils peuvent réagir avec le fer ferreux et devenir un radical alcoxy ( $\text{RO}^\bullet$ ), presque aussi réactif que le radical hydroxyle et qui continue la réaction en chaîne (21).



- ils peuvent aussi réagir avec le fer ferrique pour donner un radical peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ), tandis que le fer est réduit.



- ils peuvent être dégradés en différents produits, aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonénal), alcanes, alcènes.

Le malondialdéhyde (MDA) est un métabolite important issue de la peroxydation lipidique. Il est utilisé comme marqueur de cette dernière par la réaction à l'acide thiobarbiturique (TBA) avec formation d'un complexe coloré, dosé par spectrophotométrie, fluorimétrie ou par chromatographie liquide haute performance. Mais cette réaction ne dose pas le seul MDA préformé, les hydroperoxydes eux-même en produisant alors (12). Le MDA est très toxique et réagit facilement avec les groupements thiols SH et les groupements aminés libres  $\text{NH}_2$ . Il agit sur les protéines

et les lipides pour former des bases de Schiff qui seraient à l'origine des amas de lipofuscine caractéristiques des cellules ou le phénomène de peroxydation lipidique est intense (21).

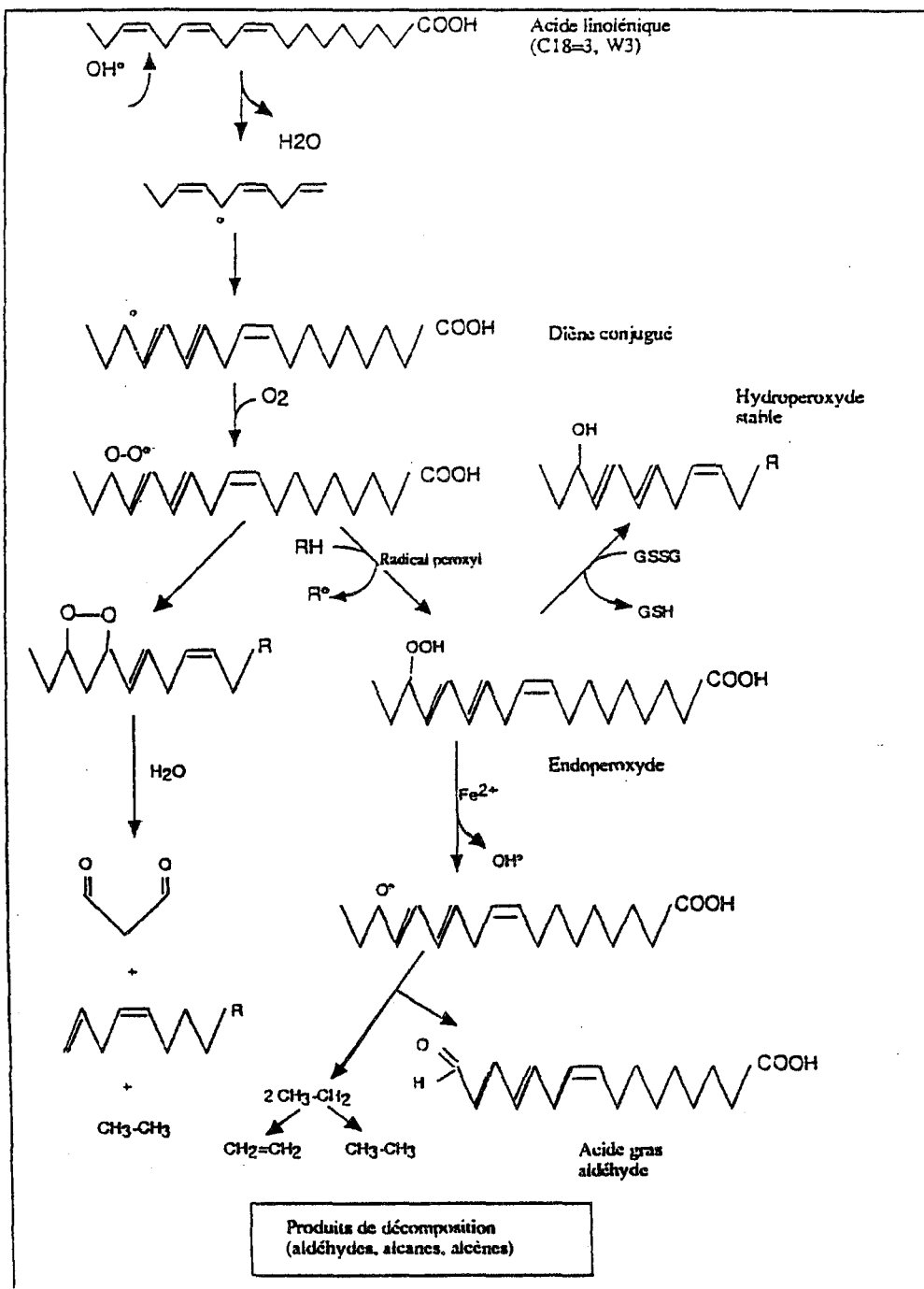
Le 4-hydroxynonéal peut réagir avec les protéines cytoplasmiques et nucléaires à fonction thiol et peut entraîner l'inactivation de certaines enzymes telles que la DNA polymérase, la glucose-6-phosphatase et l'adénylcyclase (22).

### 3./Terminaison:

La terminaison de la réaction en chaîne se traduit par la réunion de deux radicaux lipidiques pour former des dimères, ou des composés cycliques. La réaction en chaîne est aussi freinée par la rencontre de molécules pièges, telles que l'  $\alpha$  tocophérol membranaire (12).

L'attaque radicalaire des membranes lipidiques et la peroxydation en résultant peuvent donc être à l'origine d'une désorganisation profonde de l'architecture membranaire, avec perte de son intégrité et retentissement sur ses fonctions de barrière et celles liées à la reconnaissance (brèches ioniques, troubles de la perméabilité, altération de la relation récepteur-ligand).

**Figure 7:** Schéma de la peroxydation lipidique induite par le fer et le radical hydroxyle.  
D'après Favier et coll. (23).



**Figure 8:** Effets cellulaires de la peroxydation lipidique (biophysiques et biochimiques). D'après Emerit et coll. (11).

---

**A- Changement de la bicouche phospholipidique**

---

Diminution de la fluidité  
 Augmentation de la charge négative de surface  
 Apparition d'une conductivité pour les protons  
 Perte de la stabilité électrique et accroissement non spécifique de la perméabilité

---

**B- Changement des membranes et des organites cellulaires**

---

Inactivation des enzymes membranaires  
 Oxydation des groupes thiol et accroissement de la perméabilité  
 Oedème et gonflement des mitochondries  
 Découplage oxydation-phosphorylation  
 Perte de cytochrome C et inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale.  
 Perturbation du système d'hydroxylation hépatique  
 Décharge des enzymes lysosomiales  
 Activation des phospholipases membranaires

---

**C- Changement dans le métabolisme et le comportement**

---

Destruction des tocophérols, des thiols, des stéroïdes et de la thyroxine.  
 Redistribution des ions  
 Inhibition de la motilité cellulaire et ralentissement de la division cellulaire

## **6.2. Attaque des protéines**

Les radicaux libres oxygénés peuvent aussi réagir avec les protéines.

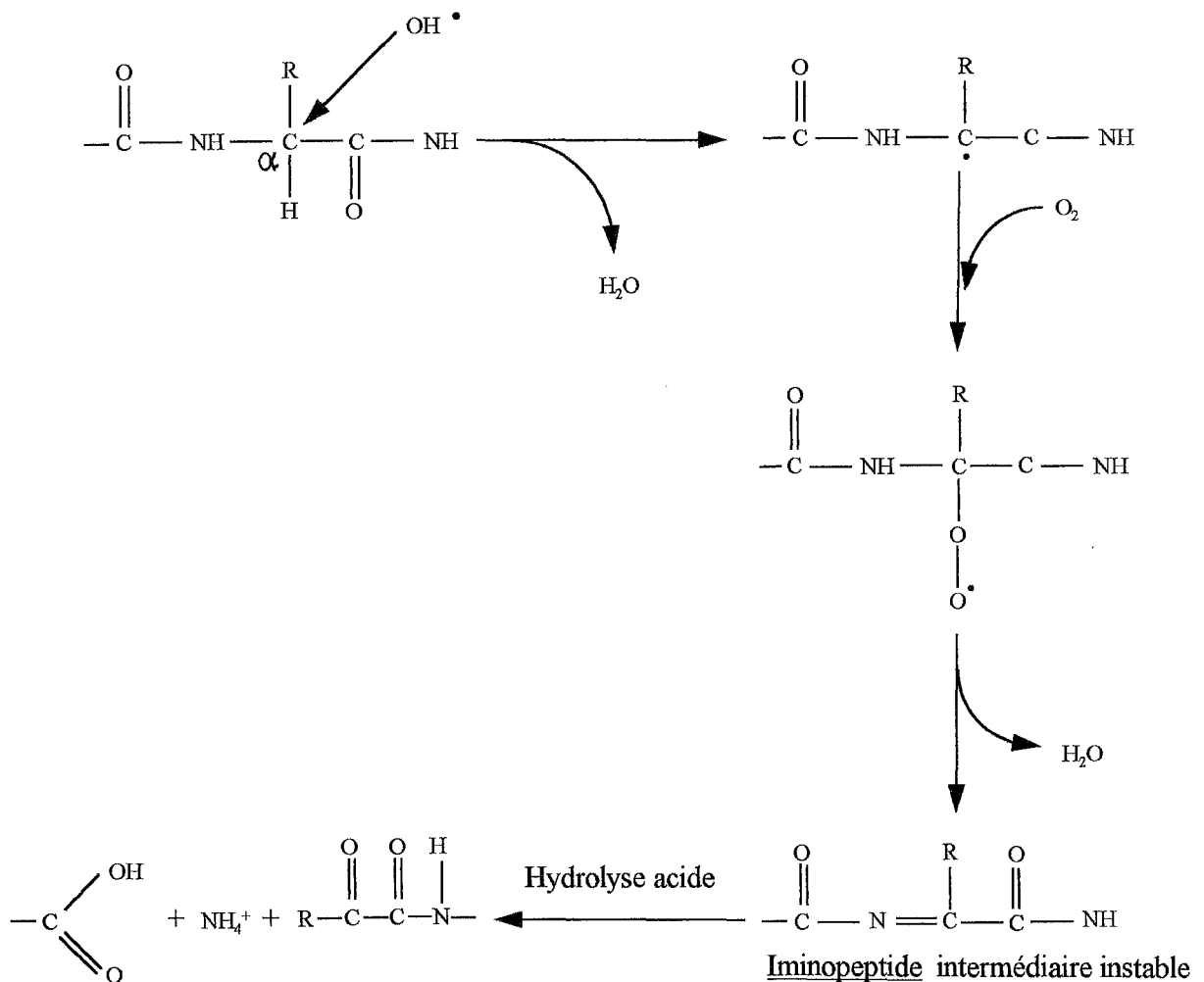
Ainsi, le radical hydroxyle attaque les chaînes peptidiques au niveau des carbones situés en  $\alpha$  par rapport à la liaison CONH, avec formation d'un intermédiaire radicalaire qui réagit avec l'oxygène en excès conduisant à un radical peroxy, qui se décompose en libérant de l'eau et un iminopeptide instable et très sensible aux attaques enzymatiques. Les iminopeptides peuvent se complexer avec les lipides oxydés formant ainsi des dépôts inertes de lipofuscine (24).

Les groupements sulfhydryles, présents dans de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport subissent sous l'action du radical hydroxyle, une déshydrogénation; il se produit une oxydation du groupement SH en disulfure (-S-S),

entraînant un inactivation de ces enzymes et une déplétion du glutathion réduit (22). Les radicaux libres peuvent aussi attaquer les groupements thiols des protéines constituant le tissu conjonctif de soutien telles que celles des microfibrilles de collagène, ainsi que l'acide hyaluronique, les mucopolysaccharides et l'élastine, induisant des polymérisations et des dépolymérisations anarchiques. Ces processus semblent à l'origine de phénomènes de sclérose et de fibrose (19).

Les radicaux libres sont donc responsables de modifications sur les acides aminés soufrés, ainsi que sur l'histidine, la tyrosine et le tryptophane. Les altération des protéines qui en résultent entraînent des troubles du métabolisme, des troubles de la reconnaissance des récepteurs tissulaires, et des altérations dans leurs propriétés biophysiques et biochimiques. En particulier, leur teneur en groupes carbonyles est accrue (15).

**Figure 9:** Attaque des protéines par le radical hydroxyle. D'après Wolff et coll. (24).



### **6.3. Attaque des acides nucléiques**

L'acide désoxyribonucléique ou ADN, est hautement sensible à l'action des radicaux libres. Les radiations ionisantes, le peroxyde d'hydrogène et d'autres peroxydes, les systèmes producteurs de radicaux superoxyde et hydroxyle possèdent des effets mutagènes et entraînent des délétions chromosomiques et des échanges de chromatides soeurs (25).

Des études "in vitro" sur des cellules eucaryotes et procaryotes ont montré que le radical hydroxyle était responsable de plus de 80% des dommages induits par les radiations ionisantes au niveau de l'ADN, avec modification des bases et scissions de brins (15). Ainsi les radicaux superoxyde et hydroxyle peuvent attaquer l'ADN au niveau du désoxyribose par arrachement d'atomes d'hydrogène, entraînant alors une fragmentation du sucre, puis des coupures de brins et formation de produits dont certains réagissent à l'acide thiobarbiturique (25). L'action du radical hydroxyle au niveau des bases conduit à l'hydroxylation de ces dernières, avec par exemple formation de thymine glycol, de 5-hydroxyméthyluracile et de 8-hydroxyguanine (25,26).

Le peroxyde d'hydrogène réagit au niveau des bases et produit des dérivés N-oxydés, tel que l'adénine N-oxyde (27). Il provoque aussi de nombreuses coupures au niveau de la chaîne d'ADN, avec formation d'une quantité importante de phosphates inorganiques, témoignant d'une rupture de la liaison sucre-phosphate (26).

Les produits de la peroxydation lipidique vont aussi interagir avec l'ADN (21):

- le malondialdéhyde induit la formation de ponts interbrins, entre les bases de l'ADN impliquant probablement la guanine, l'adénine et la cytosine et il induit aussi la formation de ponts ADN-protéines.

- le 4-hydroxynonéal induit "in vitro" sur des cultures cellulaires des échanges de chromatides soeurs et possède des propriétés mutagènes.

L'ensemble de ces réactions provoque des détériorations structurales de l'ADN qui vont conduire à des altérations dans ses fonctions avec de graves conséquences sur la multiplication cellulaire, la transmission ou la réplication du message génétique et de la synthèse des protéines, si ces dommages ne sont pas réparés par des mécanismes endogènes.



## 7. Les moyens de protection antiradicalaire de l'organisme

Les radicaux libres oxygénés semblent se former d'une manière continue au sein du tissu vivant suivant les conditions physiopathologiques. Afin de se préserver contre l'attaque radicalaire et ses conséquences, l'organisme possède un puissant système de défense, comprenant des systèmes enzymatiques, essentiellement intracellulaires, et des systèmes non enzymatiques (12).

### 7.1. Protection par des systèmes enzymatiques

#### 7.1.1. Les superoxyde-dismutases (SOD)

Ces métallo-enzymes, présentes dans les cellules qui métabolisent l'oxygène, permettent d'éliminer les anions superoxyde en accélérant, selon un mode allostérique, la vitesse de leur dismutation en peroxyde d'hydrogène (12).



Cette enzyme empêche donc l'accumulation de superoxyde mais cause la production du peroxyde d'hydrogène cytotoxique.

On distingue trois types de SOD (28):

- une SOD contenant un atome de cuivre et un atome de zinc (CuZn-SOD), caractéristique du cytosol des cellules eucaryotes.

- une SOD contenant un atome de manganèse (Mn-SOD) et située dans la matrice mitochondriale.

- une SOD contenant un atome de fer, située dans l'espace périplasmique des bactéries.

Le mode d'action de ces différentes SOD est identique: le métal du site actif est alternativement réduit par le superoxyde, puis oxydé, oscillant pour le manganèse et le fer de l'état bivalent à l'état trivalent et pour le cuivre de l'état monovalent à l'état bivalent.

### 7.1.2. La catalase

C'est une hémoprotéine, localisée au niveau des peroxyosomes (organites cellulaires jouant un rôle important dans la détoxification de divers produits). Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction (12,13):

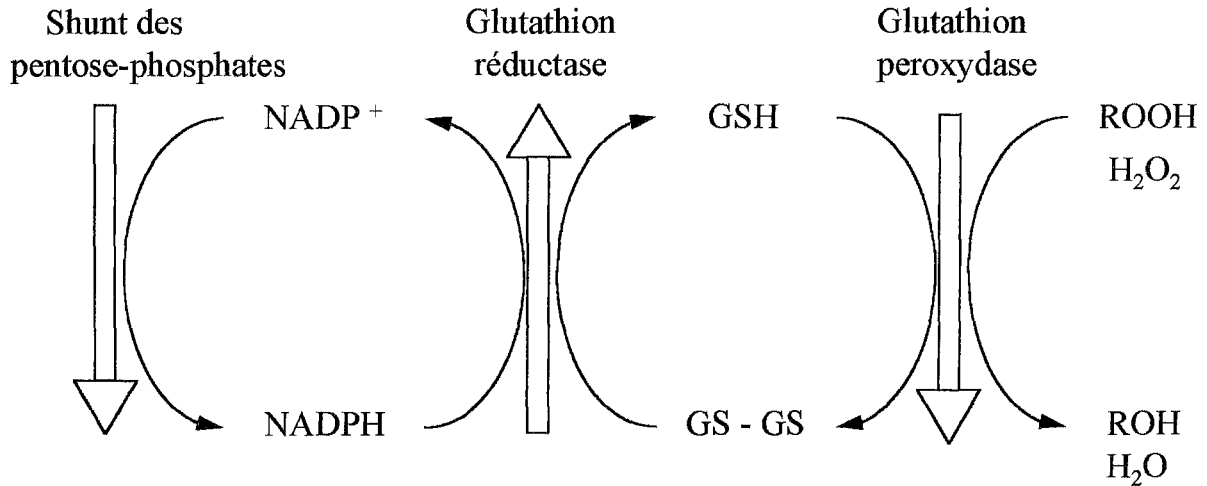


Elle élimine donc le peroxyde d'hydrogène et l'empêche de réagir avec certains métaux de transition pour former le radical hydroxyle lors de la réaction de Fenton ou le cycle d'Haber-Weiss. Son activité est cependant limitée par sa localisation exclusive dans les peroxyosomes. Ainsi, les cellules dépourvues de ces organites, telles que les cellules nerveuses, sont les plus sensibles à la peroxydation engendrée par une atmosphère hyperbare (14).

### 7.1.3. La glutathion peroxydase séléno-dépendante (GPx)

C'est une enzyme ubiquitaire, localisée dans le cytoplasme et les membranes cellulaires, ainsi que dans les mitochondries (13). Elle est séléno-dépendante (présence d'une séléno-méthionine dans son site actif) et son activité dépend de la présence de cet oligo-élément dans le milieu. Elle catalyse la réduction par le glutathion réduit (GSH) de tous les substrats hydroperoxydés, depuis le peroxyde d'hydrogène jusqu'aux peroxydes lipidiques. Le glutathion oxydé au cours de la réaction est réduit par la glutathion réductase, son cofacteur étant le NADPH qui provient du shunt de la voie des pentose-phosphates sous l'action de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (12,14).

**Figure 10:** Mode d'action de la glutathion peroxydase séléno-dépendante. D'après Reilly et coll. (12).



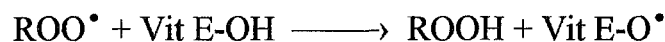
#### 7.1.4. La glutathion S transférase $\pi$

La glutathion S transférase  $\pi$  possède une activité peroxydasique et peut réduire les peroxydes lipidiques mais pas le peroxyde d'hydrogène (183).

### 7.2. Protection par des systèmes non enzymatiques

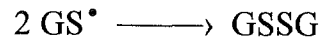
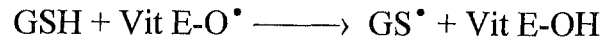
#### 7.2.1. L' $\alpha$ -tocophérol ou vitamine E

La vitamine E est un composé possédant un groupement phénol et le caractère hydrophobe de ces molécules permet leur insertion au sein des membranes phospholipidiques, où elles ont un rôle protecteur contre la lipoperoxydation, en empêchant la propagation de la chaîne radicalaire (11,12). Elle agit comme un donneur d'hydrogène vis à vis de ces radicaux libres, par l'intermédiaire du groupement hydroxyle fixé sur son cycle benzénique, en produisant une "vitamine E radicalaire", de faible réactivité, qui stoppe la réaction en chaîne par la formation de dimères ou de produits inertes (14).



La "vitamine E radicalaire" doit donc être réduite par un donneur d'hydrogène, présent dans le milieu, tel que (12,14):

- le glutathion (équation ci-dessous)
- l'acide ascorbique (vitamine C).



### 7.2.2. Le $\beta$ -carotène ou vitamine A

Cette provitamine, liposoluble, est essentiellement connue pour ses propriétés de désactivation de l'oxygène singulet (11). La vitamine A piège l'oxygène singulet par un processus physique, grâce à un changement de sa conformation stéréochimique (de l'isomère cis-cis à l'isomère cis-trans) et elle absorbe l'énergie libérée lors de la désactivation de l'oxygène singulet en oxygène fondamental.

### 7.2.3. L'acide ascorbique ou vitamine C

La vitamine C, vitamine hydrosoluble, est un antioxydant direct par piégage des radicaux libres, et un antioxydant indirect puisqu'elle permet la régénération de la vitamine E oxydée. Par contre, l'ascorbate peut aussi réduire le fer ferrique et être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés (12).

### 7.2.4. Les chélateurs des métaux de transition

Certaines substances physiologiques inhibent la formation du radical hydroxyle via la réaction de Fenton et le cycle d'Haber-Weiss en formant avec les métaux de transition des complexes métalliques (12,16).

- la transferrine (ou sidérophiline)

C'est une  $\beta$  globuline qui véhicule le fer plasmatique

- la ferritine:

Elle est sécrétée par les neutrophiles et représente la réserve labile du fer.

- la céruléoplasmine:

C'est une protéine vectrice du cuivre et qui possède une activité ferroxidasique, en oxydant les ions ferreux en ions ferriques et permettant l'assimilation de ce métal. Elle permet aussi d'inhiber la lipoperoxydation liée au sel ferreux via la réaction de Fenton. De plus, elle possède une activité de piègeur des radicaux superoxyde et hydroxyle.

- l'albumine: elle assure le transport de certains métaux de transition (cuivre, nickel) et on lui prête des propriétés de piègeur des radicaux peroxy et hydroxyle.

### **7.2.5. Les métallothionéines**

Les métallothionéines sont des métallo-protéines de bas poids moléculaire. Elles sont très riches en acides aminés soufrés (cystéine), qui permettent la prise en charge de certains oligoéléments. Les métallothionéines piègent les radicaux hydroxyle et superoxyde grâce à leurs fonctions thiols (16).

### **7.2.6. Le glutathion**

Le glutathion est un tripeptide composé de trois acides aminés, l'acide glutamique (Glu), la cystéine (Cys) et la glycine (Gly). Ses propriétés découlent essentiellement de la présence du groupe thiol de la cystéine qui peut s'oxyder sous l'influence de divers réactifs. Le glutathion possède une action antioxydante puisqu'il réduit le peroxyde d'hydrogène en une molécule d'eau grâce à la glutathion peroxydase.

### **7.2.7. Autres substances**

La bilirubine, l'acide urique et certains lipides posséderaient également des propriétés antioxydantes.

## **DEUXIEME PARTIE**

# **PRODUCTION ET EFFETS DES RADICAUX LIBRES INDUITS PAR LES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX**

## **CHAPITRE III:ANTICANCEREUX ET RADICAUX LIBRES**

De nombreux agents anticancéreux peuvent former, surtout au cours de leur activation métabolique, des espèces radicalaires dérivées ainsi que des radicaux libres oxygénés qui, du fait de leur forte réactivité, peuvent interagir avec les macromolécules (ADN, lipides et protéines) et participer ainsi à l'activité cytotoxique et/ou à la toxicité de ces agents antitumoraux. Nous examinerons les médicaments qui ont été le plus étudiés sous cet angle, ce qui n'implique pas qu'ils seraient les seuls à agir ainsi.

Parmi ces agents anticancéreux, aux structures chimiques différentes, les dérivés quinoniques (anthracycline, mitomycine C) et la bléomycine sont ceux dont le mécanisme d'action radicalaire est le mieux compris actuellement.

### **1. les anthracyclines**

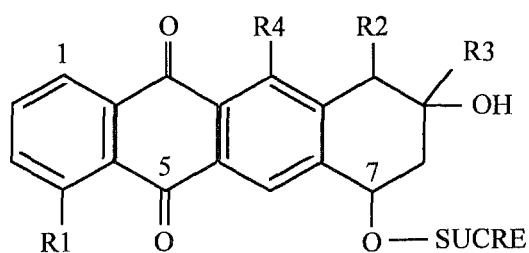
Les anthracyclines sont des dérivés quinoniques, largement utilisés en thérapeutique anticancéreuse. A partir de deux molécules de référence, la doxorubicine (ou adriamycine) et la daunorubicine, les recherches de nouvelles molécules actives, moins toxiques et l'étude des relations structure-activité ont conduit à l'extraction ou à la synthèse de plusieurs milliers de molécules, dont un petit nombre s'est avéré actif.

La molécule de base des anthracyclines est constituée de deux parties distinctes:

- un aglycone, groupement chromophore dérivé du naphtacène.
- un sucre aminé sur le carbone 7.

Les modifications par rapport à la structure originale ont porté sur les cycles, la chaîne latérale (zorubicine) et sur la partie osidique de la molécule qui a pu soit être épimérisée (épirubicine), soit être substituée (aclarubicine).

**Figure 11:** Structure chimique des anthracyclines utilisées en thérapeutique (1,5).



	R1	R2	R3	R4	SUCRE
Doxorubicine	OCH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>2</sub> OH	OH	
Daunorubicine	OCH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	OH	Idem
Zorubicine	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub> NNHCOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	OH	Idem
Idarubicine	H	H	COCH <sub>3</sub>	OH	Idem
Epirubicine	OCH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>2</sub> OH	OH	
Aclarubicine	OH	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	

Le mécanisme d'action des anthracyclines associe plusieurs particularités conduisant à l'inhibition de la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines (5):

- une liaison intercalante au niveau de l'ADN, le chromophore se plaçant entre deux paires de bases de l'ADN et la partie osidique interagissant avec les désoxyriboses phosphates.
- une liaison à la topoisomérase II, induisant des cassures d'ADN.
- la production de radicaux libres oxygénés lors du cycle rédox de l'anthracycline.

Les indications de la doxorubicine ou adriamycine (ADRIBLASTINE\*) sont nombreuses, son spectre d'activité étant large. La doxorubicine est utilisée dans les hémopathies malignes, dans les cancers du sein, du tractus digestifs, les cancers génitaux et les cancers bronchiques.

La daunorubicine (CERUBIDINE\*), l'aclarubicine (ACLACINOMYCINE\*), l'idarubicine (ZAVEDOS\*) et la zorubicine (RUBIDAZONE\*) sont le plus souvent utilisées en association dans les leucémies aiguës.

L'épirubicine (FARMORUBICINE\*) est utilisée en association dans les cancers du sein, les cancers du poumon et dans les cancers épidermoïdes de la sphère oto-rhino-laryngologique.

Certains effets indésirables diffèrent assez peu entre les différentes anthracyclines. Ce sont (1):

- une toxicité hématologique portant sur les trois lignées sanguines.
- une toxicité sur les muqueuses avec inflammation, abrasion et érosion, surtout au niveau de la muqueuse bucco-digestive qui se traduit par des douleurs bucco-pharyngées, des dysphagies et des diarrhées parfois importantes.
- des nausées et des vomissements.
- une alopecie, quasi obligatoire (sauf avec l'aclacinomycine).

Par contre, la survenue d'une cardiomyopathie de type congestif, est la complication principale de la doxorubicine et de la daunorubicine, celle-ci étant beaucoup plus faible avec les autres anthracyclines. En pratique, il existe deux types d'effets cardiotoxiques:

- les effets précoces ou toxicité aiguë.
- les effets tardifs ou toxicité chronique, correspondant à l'insuffisance cardiaque congestive.

La toxicité aiguë peut apparaître dans les minutes, voire les heures suivant l'injection intraveineuse et n'est pas dose-dépendante. Elle est le plus souvent transitoire et sa fréquence d'apparition varie de 10 à 40 % selon les auteurs (8). Sur le plan clinique, elle se traduit par une tachycardie ainsi qu'une hypotension et peut également causer une diminution de la fonction ventriculaire. Cependant, les principales manifestations toxiques aiguës sont d'ordre électrocardiographique avec des troubles du rythme, des



troubles de la conduction et des troubles de la repolarisation. Ces manifestations régressent généralement spontanément (60).

La toxicité chronique est dose-dépendante. Sa fréquence augmente fortement à partir d'une dose totale de 550mg/m<sup>2</sup> pour la doxorubicine et de 600mg/m<sup>2</sup> pour la daunorubicine. Une fois révélée, elle évolue vers la mort dans plus de 60% des cas.

Les signes de la toxicité chronique correspondent à ceux de l'insuffisance cardiaque, ils peuvent survenir brusquement et se manifester par une tachycardie inexplicée, une fatigue persistante, une toux sèche, une dyspnée d'effort puis de décubitus. On peut observer à la période d'état un oedème des membres inférieurs, une cardiomégalie, une hépatomégalie, un épanchement pleural et un oedème pulmonaire (60).

Les lésions incluent, au niveau histologique une diminution des fibres musculaires avec augmentation de la masse du tissu interstitiel, une raréfaction des myofibrilles, une vacuolisation cytoplasmique due au gonflement du système sarcotubulaire, un gonflement des mitochondries, des noyaux élargis et une augmentation du nombre des lysosomes (73).

## **1.1. Anthracyclines et production de radicaux libres**

Une caractéristique des quinones est leur capacité à subir une oxydation et une réduction réversibles, et de former après la réduction à un électron, le radical libre semi-quinone. La plupart des études sur la production d'espèces radicalaires par les anthracyclines ont été menées avec la doxorubicine et la daunorubicine.

### **1.1.1. Formation du radical semi-quinone**

Sato et coll. (29) ont montré au moyen de la résonance paramagnétique électronique (RPE) la formation du radical semi-quinone, à partir de doxorubicine et de daunorubicine incubées en présence de NADPH et de microsomes hépatiques de rat. La RPE est la méthode la plus utilisée pour mettre en évidence "in vitro" les radicaux libres, elle permet de caractériser le moment magnétique dû au spin de l'électron non-apparié et d'individualiser ainsi l'espèce radicalaire, les radicaux libres étant stabilisés par l'emploi de piègeurs de spin tel que le 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde (DMPO) ou le  $\alpha$  phényl-N-tert-butyl nitron (PBN).

Depuis, de nombreuses études ont démontré que les anthracyclines, quand elles sont réduites chimiquement ou enzymatiquement (réduction mono-électronique) forment un radical semi-quinone (30). Les enzymes impliquées dans la réduction des anthracyclines sont des flavoprotéines:

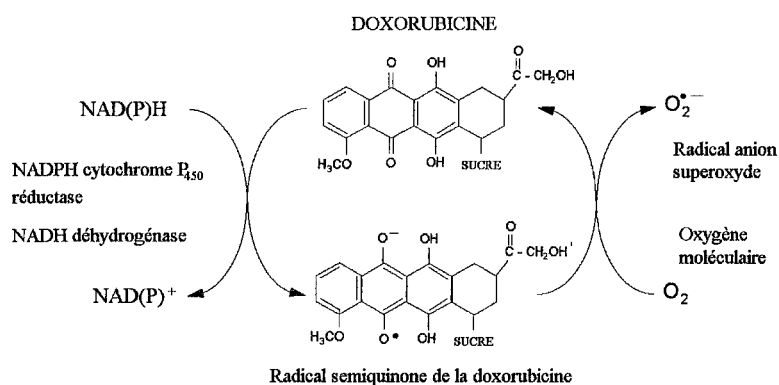
- les cytochromes P450 réductases, mitochondriales et microsomiales.
- la NADH déshydrogénase mitochondriale.
- la xanthine oxydase.

En solution aqueuse, Pietronigro et coll. (33) ont montrés par RPE que la doxorubicine formait spontanément, à pH physiologique un radical semi-quinone, mais à un taux beaucoup plus faible que lorsque la réaction est catalysée enzymatiquement.

### 1.1.2. Formation de l'anion superoxyde

En milieu aérobie, la doxorubicine semi-quinone réagit avec l'oxygène avec une constante de vitesse de réaction de  $3.10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (31). Des études par RPE, utilisant le DMPO (29) ou le PBN (32) pour obtenir un adduit stable de l'anion superoxyde, ont montré que celui-ci est l'espèce oxygénée formée initialement lors de la réaction du radical semi-quinone de la doxorubicine et de la daunorubicine avec l'oxygène. Le radical superoxyde provient du transfert d'un électron du radical semi-quinone à l'oxygène.

**Figure 12:** Formation de l'anion superoxyde lors du cycle rédox de la doxorubicine. D'après Mimnaugh et coll. (72)



### 1.1.3. Formation du radical hydroxyle

La production du radical superoxyde, lors du cycle redox de l'anthracycline catalysé par la NADPH cytochrome P450 réductase ou la NADH déshydrogénase, s'accompagne aussi de la formation du radical hydroxyle objectivée par RPE (32,34,35).

Plusieurs voies peuvent être envisagées pour expliquer la formation de ce radical (35):

- l'anion superoxyde peut se dismuter spontanément pour former le peroxyde d'hydrogène qui peut alors réagir avec l'anion superoxyde restant et produire en présence de traces de fer, lors de la réaction d'Haber-Weiss, le radical hydroxyle.

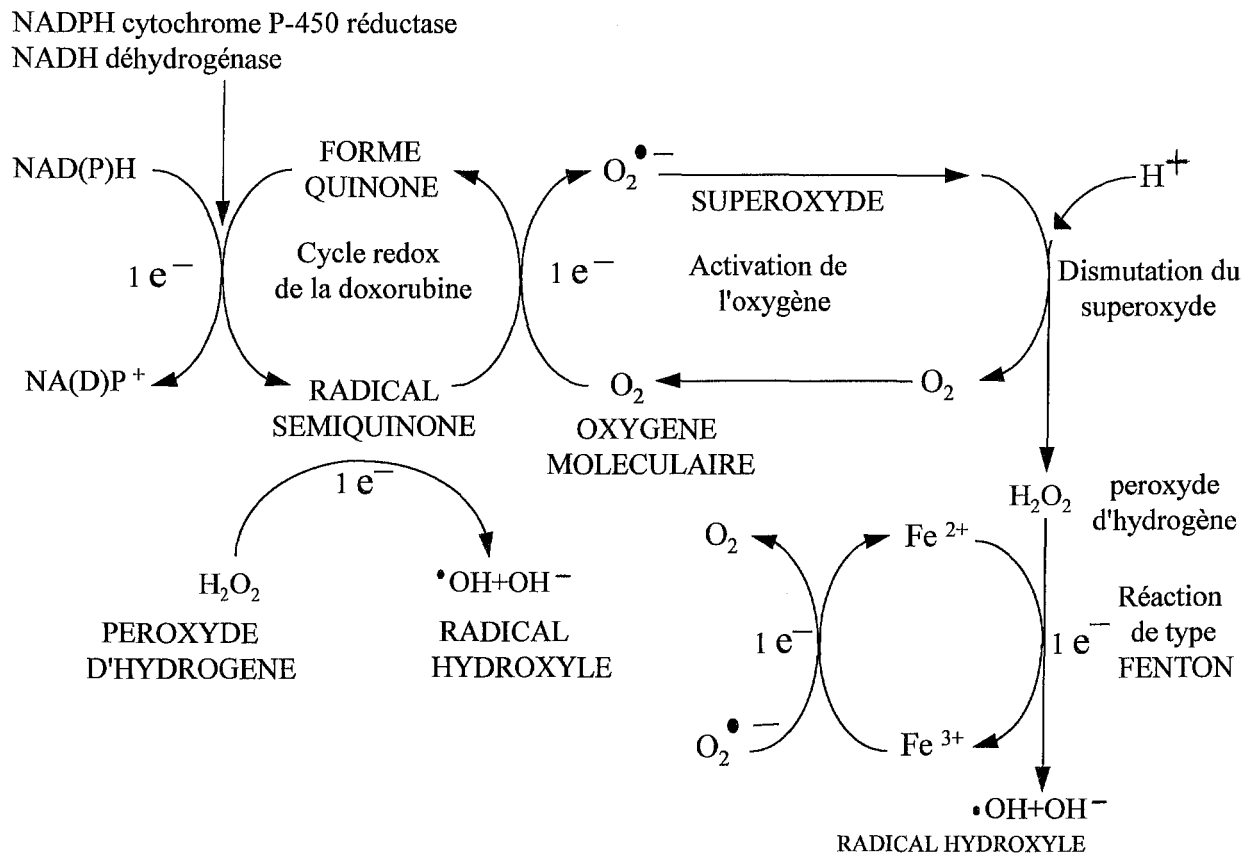
- le peroxyde d'hydrogène peut réagir directement avec les ions ferreux par la réaction de Fenton et donner le radical hydroxyle.

Ce radical peut être formé aussi par la réaction directe du radical semi-quinone de l'anthracycline avec le peroxyde d'hydrogène. Cette réaction est plus importante sous atmosphère azotée puisqu'en présence d'oxygène, le radical semiquinone réduit celui-ci de façon prioritaire pour former l'anion superoxyde (36,37).

De plus, d'autres radicaux que le radical hydroxyle pourraient être formés lors de la réaction du radical semi-quinone avec le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, la dégradation du désoxyribose se produisant dans un milieu réactionnel contenant le radical semi-quinone de la doxorubicine et du peroxyde d'hydrogène est inhibée par certains des agents piègeurs du radical hydroxyle, mais non par tous. La formation d'espèces radicalaires plus sélectives dans leur réactivité que le radical hydroxyle, des "crypto-radicaux hydroxyle" a été évoquée (37).

La production de radicaux libres oxygénés, médiée par les anthracyclines, a été mise en évidence dans tous les tissus étudiés, comme les tissus hépatiques, cardiaques, rénaux, pancréatiques et chez l'érythrocyte (30).

**Figure 13:** Réduction monoélectronique de la doxorubicine et production associée de radicaux libres. D'après Mimnaugh et coll. (58).



#### 1.1.4. Formation d'un complexe anthracycline-métal

La doxorubicine et la daunorubicine forment des complexes avec le fer ferrique avec libération d'un proton par molécule d'anthracycline, et liaison de trois molécules d'anthracycline pour un Fe (III), chaque molécule étant chélatée par un carbonyl et un phénolate, donnant un complexe à six membres. La constante de stabilité du complexe-doxorubicine Fe (III) est extrêmement élevée ( $2.5 \cdot 10^{28}$ ) et il n'est pas dissocié par des composants plasmatiques tels que la ferritine (38).

Par contre la doxorubicine est capable d'extraire Fe(III) de la ferritine, forme majeure de stockage du fer dans les cellules, lors d'une réaction qui est médiée par la réduction de Fe(III) en Fe(II) dûe au radical semi-quinone de l'anthracycline ou au superoxyde (39).

Des expériences de RPE montrent que la doxorubicine réduit (mais faiblement) le Fe(III) lié en Fe(II) avec la formation d'un complexe où la doxorubicine est sous la forme du radical semi-quinone. En présence d'oxygène, le Fe (II) lié est rapidement

réoxydé en Fe (III) et un électron est transféré à l'oxygène, pour donner le radical superoxyde et du peroxyde d'hydrogène. L'addition d'un puissant chélateur spécifique de Fe(II) inhibe la réaction, indiquant que Fe(II) est essentiel dans la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde (40).

Gutteridge (41) a proposé un mécanisme réactionnel où le complexe doxorubicine-Fe(III), par un transfert électronique intramoléculaire peut donner le complexe doxorubicine<sup>•</sup>-Fe(II), ( la doxorubicine étant sous sa forme semi-quinonique). La formation ultérieure de radicaux libres oxygénés en aérobiose en découle.

Les réactions du complexe doxorubicine-Fe peuvent être résumées comme suit (41):

- (1)  $\text{DXH}_2 + \text{Fe}^{3+} \longrightarrow \text{DX}^- - \text{Fe}^{3+} + 2\text{H}^+$
- (2)  $\text{DX}^- - \text{Fe}^{3+} \longleftrightarrow \text{DX}^\bullet - \text{Fe}^{2+} \longleftrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{DX}^\bullet$
- (3)  $\text{Fe}^{2+} (\text{ou } \text{DX}^\bullet - \text{Fe}^{2+}) + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^{\bullet-}$
- (4)  $\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-}$
- (5)  $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
- (6)  $\text{Fe}^{2+} (\text{ou } \text{DX}^\bullet - \text{Fe}^{2+}) + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$
- (7)  $\text{DX}^\bullet + \text{H}_2\text{O}_2 \text{---Fe---} \longrightarrow \text{DX}^+ + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$

Avec  $\text{DXH}_2 = \text{Doxorubicine}$        $\text{DX}^\bullet = \text{Radical semiquinone}$

De plus, les substances contenant des groupements thiol, telles que la cystéine ou le glutathion ainsi que des protéines membranaires réduisent le complexe doxorubicine-Fe (III) sans entraîner la formation du radical semiquinone (40,42). Lors de cette réaction, il y a consommation d'oxygène et formation de superoxyde et du peroxyde d'hydrogène.

La production de radicaux libres oxygénés par les anthracyclines pourrait donc s'effectuer par deux mécanismes distincts:

- formation d'un radical semi-quinone par réduction monoélectronique impliquant une catalyse enzymatique.
- formation du complexe doxorubicine-Fe(III).

La doxorubicine forme aussi avec le cuivre un complexe 1:1. Le complexe doxorubicine-Cu(II) réduit l'oxygène moléculaire en radical anion superoxyde (43).

Wallace (43) a suggéré que ce complexe pourrait être la forme importante des anthracyclines dans le sang, le cuivre libre étant plus abondant et la disponibilité du fer limitée.

## **1.2 Cytotoxicité des anthracyclines et radicaux libres**

### **1.2.1. Cytotoxicité médiée par les métabolites des anthracyclines**

"In vitro", la réduction de la doxorubicine aboutit à la formation de métabolites pouvant se lier de façon covalente avec l'ADN (44) et les protéines (45,46). Ainsi, la doxorubicine incubée en présence de microsomes cardiaques et hépatiques de rat forme des métabolites se liant aux protéines microsomales, selon un processus dépendant de la teneur en NADPH dans le milieu et qui est inhibé par l'ajout de glutathion (45) mais pas par celui de SOD (46).

Sinha et coll. (44) ont montré que la doxorubicine, incubée en présence de noyaux d'hépatocytes de rat en anaérobiose aboutit à la formation de métabolites qui se lient à l'ADN. La liaison métabolites-ADN diminue fortement quand la concentration en oxygène augmente, suggérant donc que les espèces impliquées dans la liaison dérivent du radical semiquinone (la voie préférentielle en aérobie étant la formation de l'anion superoxyde). L'espèce impliquée dans la liaison pourrait être le radical en C7, formé à partir du radical semiquinone après élimination de la partie osidique (47). En effet:

- la 7-déoxyglycone-doxorubicine a été détectée in vitro et in vivo durant le métabolisme de la doxorubicine.

- la formation de dimères, par la liaison de deux molécules de 7-déoxyglycone-doxorubicine en C7-C7 a été mise en évidence après réduction de la doxorubicine par la NADPH cytochrome C réductase microsomiale.

Nous noterons aussi que la réduction à deux électrons par les DT diaphorases aboutit à la formation d'une quinone méthide en C7 capable de se lier à l'ADN (47).

La formation d'espèces radicalaires dérivées des anthracyclines au cours de leur métabolisme pourrait donc contribuer à l'activité cytotoxique par le biais de la formation de liaisons covalentes à l'ADN. Cependant, ce processus demeure hypothétique.

### 1.2.2. Cytotoxicité médiée par les radicaux libres oxygénés:

Plusieurs travaux "in vitro" ont montré que les piègeurs des radicaux hydroxyle, les agents chélateurs du fer, la catalase, la SOD réduisent la cytotoxicité de la doxorubicine et de la daunorubicine sur des cultures de cellules tumorales, suggérant l'implication de la production dépendante du fer du radical hydroxyle dans la cytotoxicité des anthracyclines (48-50). Par contre, les différents piègeurs utilisés n'ont pas d'action sur l'activité anti-tumorale de la 5-iminodaunorubicine, un analogue structural de la daunorubicine dont la substitution en 5 sur le cycle quinonique d'un groupement imine empêche la réduction en radical semiquinone et la production d'anions superoxyde (49).

Doroshov (49) suggère que la production intracellulaire de peroxyde d'hydrogène est un facteur important de la cytotoxicité in vitro de la doxorubicine et de la daunorubicine. Ainsi la catalase et le PZ51 (2-phényl-1,2-benzisosélénazol-3(2H)-one), un composé possédant une activité proche de la glutathion peroxydase et pouvant détoxifier le peroxyde d'hydrogène en présence de glutathion, protège les cellules tumorales d'Ehrlich contre la cytotoxicité de la doxorubicine.

De plus, des études effectuées sur différentes lignées de cellules tumorales mammaires MCF7 présentant des sensibilités différentes à l'activité cytotoxique de la doxorubicine ont montré une corrélation positive entre la quantité de radicaux hydroxyles produits par la doxorubicine et sa cytotoxicité sur les différentes lignées (50).

En outre, Buzzi et coll. (51) rapportent que la moindre sensibilité des cellules tumorales d'Ehrlich envers la doxorubicine par rapport aux cellules tumorales Yoshida peut-être corrélée à la nette augmentation de l'activité de la glutathion peroxydase et donc à l'augmentation de la détoxification des hydroperoxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, l'accumulation intracellulaire en doxorubicine et la formation du radical semiquinone étant équivalente au niveau des deux lignées.

Enfin, la déplétion intracellulaire du glutathion réduit qui permet la détoxification des radicaux libres, entraîne une nette augmentation de la cytotoxicité de la doxorubicine envers les cellules tumorales d'Ehrlich et les cellules MCF7 (52).

#### 1.2.2.1. Dégradation de l'ADN

Des études "in vitro" ont montré que les anthracyclines, réduites enzymatiquement par la NADPH cytochrome P450 réductase ou par la NADH déhydrogénase sont capables de dégrader l'ADN, via la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Par le même mécanisme, la doxorubicine et la daunorubicine provoquent aussi la dégradation du désoxyribose (36,37).

Berlin et coll. (53) utilisant de la doxorubicine en présence de NADPH cytochrome P450 réductase et de NADPH en aérobie, ont observé des cassures simple brin d'ADN

avec une fréquence d'une cassure pour cent nucléotides, et cette proportion était considérablement réduite sous atmosphère azotée.

Haidle et coll. (54) dans le système doxorubicine et NADH déhydrogénase constatent aussi des cassures de simple brin d'ADN avec un rapport de une cassure pour dix kilobases, mais les auteurs concluent qu'avec un tel rapport, les cassures seraient *in vivo* rapidement réparées.

De plus, Hakman et coll. (55) ont montré que la doxorubicine incubée avec la NADH déhydrogénase, du NADH et du Fe(III) entraîne la formation du radical hydroxyle, qui est "piégé" par ajout de chromatine dans le milieu réactionnel. Ils observent alors une modification au niveau des bases médiée par le radical hydroxyle avec apparition de bases hydroxylées (5,6-dihydrocytosine, 8-hydroxy-adénine, 5-hydroxyméthyl-uracile), la production de bases modifiées requérant la présence de Fe(III) et augmentant par addition de NADH. Les auteurs concluent que, comme la doxorubicine est utilisée à doses thérapeutiques au cours de l'expérience, les modifications au niveau des bases induites par les radicaux hydroxyle pourraient contribuer *"in vivo"* à la cytotoxicité et à l'action mutagène de l'anticancéreux.

Cependant d'autres auteurs contestent l'implication *"in vivo"* des radicaux libres oxygénés produits par les anthracyclines dans les dommages à l'ADN. En effet, le radical semi-quinone perd complètement son pouvoir rédox lorsqu'il est intercalé à l'ADN et ne produit plus de radicaux libres (53,57). De plus, ce radical formé par des flavoenzymes telles que la NADPH cytochrome P450 réductase localisée dans le réticulum endoplasmique, devrait être assez stable pour diffuser au niveau de leur site d'action présumé, à l'intérieur du noyau et à une distance de plusieurs micromètres. Or, le radical semiquinone et les radicaux libres oxygénés ont un demi-vie très courte et ne peuvent diffuser aussi loin dans des conditions physiologiques (56). Toutefois, l'oxyde nitrique, dernier découvert parmi les radicaux semble capable de diffuser à distance, mais nous ne disposons pas de preuves de sa production vraisemblable lors de l'action des agents anticancéreux.

Cependant, même si l'oxyde nitrique n'est pas impliqué, la doxorubicine peut-être réduite par la NADPH cytochromes P 450 réductase de la membrane nucléaire en radical semi-quinone et donc au niveau d'un site proche de l'ADN (58).

Enfin Mundi et coll. (42) ont montré que la doxorubicine et la daunorubicine sous forme complexée avec le fer peuvent s'intercaler au niveau de l'ADN, et former un complexe ternaire où l'anthracycline conserve ses propriétés de "rédox-cycling". Il demeure aussi efficace en ce qui concerne le transfert d'un électron à l'oxygène moléculaire par un mécanisme d'auto-réduction et est capable, en présence de peroxyde d'hydrogène, de produire le radical hydroxyle et de cliver l'ADN. Dans ces conditions, la production des radicaux hydroxyles est nettement plus importante par le complexe ternaire doxorubicine-Fe(III)-ADN que par le complexe doxorubicine-Fe(III) seul.



### 1.2.2.2. Peroxydation lipidique

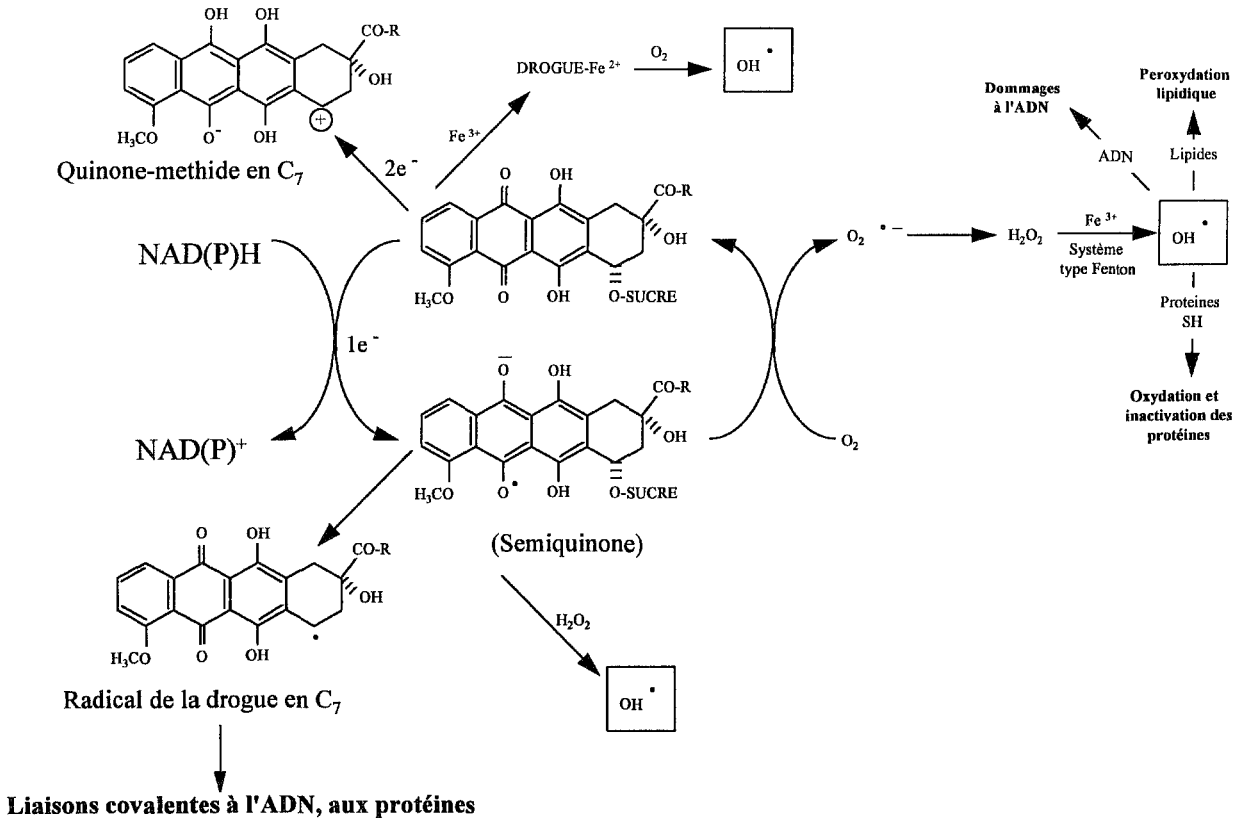
Les radicaux libres peuvent endommager d'autres structures moléculaires que l'ADN, et la peroxydation lipidique souvent évoquée pour expliquer la cardiotoxicité des anthracyclines pourrait participer aussi à leur cytotoxicité.

Ainsi, Okamoto et coll. (59) ont montré que la doxorubicine produit sur des cellules tumorales d'Ehrlich une augmentation de la peroxydation lipidique, qui est inhibée par l'ajout de vitamine E dans le milieu de culture. La doxorubicine incubée avec des noyaux isolés d'hépatocytes de rat en présence de NADPH augmente également la peroxydation lipidique des phospholipides insaturés de la membrane nucléaire (58).

Selon Mimnaugh et coll. (58), les dommages peroxydatifs engendrés par les radicaux libres au niveau de la membrane nucléaire pourraient contribuer aux altérations morphologiques et biochimiques au niveau du noyau après traitement à la doxorubicine et jouerait ainsi un rôle important dans la cytotoxicité des anthracyclines. Ceci pourrait expliquer aussi pourquoi l'AD-32 (N-trifluoroacétyl-doxorubicine-14 valérate), un dérivé de la doxorubicine qui ne s'intercale pas au niveau de l'ADN et qui apparemment ne traverse pas les membranes nucléaires s'avère tout de même cytotoxique et entraîne des cassures d'ADN, avec formation d'adduits ADN-protéine au niveau des cellules tumorales (58).

**Figure 14** : Les différentes espèces produites lors de l'activation à 1 ou 2 électrons de la doxorubicine et leur implication possible dans la cytotoxicité de la doxorubicine.  
D'après Sinha (47).

Liaisons covalentes à l'ADN, aux protéines



### 1.3. Cardiotoxicité des anthracyclines et radicaux libres

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la toxicité cardiaque des anthracyclines, aucun d'eux ne pouvant expliquer l'ensemble des modifications histologiques retrouvées au cours de l'évolution de la cardiomyopathie (60).

- une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium myocardique due à des modifications membranaires causées par l'anthracycline et à une baisse de l'activité de l'enzyme membranaire Na K ATPase.

- une interaction de l'anthracycline avec les protéines myofibrillaires cardiaques entraînant une altération de la contractilité.

- une détérioration de la structure de l'ADN des myocytes par fixation de l'anthracycline, avec inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN.

- une diminution de la concentration des polyribosomes cardiaques liée à une baisse des teneurs d'ARN myocardique.

- et surtout une toxicité médiée par les radicaux libres produits par les anthracyclines.

En effet plusieurs études montrent un lien entre la cardiotoxicité de différentes anthracyclines et leur capacité à produire des radicaux libres oxygénés durant leur cycle rédox. Ainsi, Lown et coll (61) ont montré une corrélation positive entre la production de radicaux libres oxygénés par une série d'anthracyclines modifiées et leur cardiotoxicité chez le rat. Les modifications structurales portent sur la partie aglycone et sur la partie osidique. Par exemple, l'introduction sur la fonction amine de la partie osidique de deux groupement benzyl induit une nette diminution de la capacité de l'anthracycline à être réduite et à produire l'anion superoxyde et entraîne une réduction de la cardiotoxicité (mesurée par les changements électrocardiographiques). Inversement, la N-méthylation du groupement osidique induit une réduction et une réoxydation plus faciles du chromophore avec une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés, corrélée à une augmentation significative de sa cardiotoxicité. La 5-iminodaunorubicine, dans laquelle un groupe imine est substitué en C5 et qui ne subit pas de réduction enzymatique pour former un radical semi-quinone, ne produit pas de radicaux superoxyde ni de radicaux hydroxyle est nettement moins cardiotoxique chez l'animal que la doxorubicine et la daunorubicine (61,62).

La 4-déoxydoxorubicine et la 4-déméthoxydaunorubicine ne produisent pas spontanément des radicaux libres en solution aqueuse aérée, contrairement à la doxorubicine et à la daunorubicine, et sont moins cardiotoxiques chez l'animal. Ces deux composés sont cependant aussi actifs que la doxorubicine sur la consommation d'oxygène, quand ils sont incubés avec des microsomes hépatiques de rat et du NADPH (63).

De plus, le coeur pourrait présenter une capacité moindre à lutter contre la toxicité des radicaux libres oxygénés en raison d'une concentration peu élevée en superoxyde dismutase, en catalase et en glutathion peroxydase ; ceci pourrait expliquer la survenue de dommages accrus causés par l'attaque radicalaire médiée par les anthracyclines (64). L'administration de doxorubicine chez la souris et le rat entraîne au niveau cardiaque une diminution sélective de teneur en glutathion peroxydase ainsi qu'une déplétion en glutathion (65) et une augmentation de la superoxyde dismutase (66) probablement dûe au stress oxydatif causé par l'anthracycline.

### **1.3.1. Production de radicaux libres par les anthracyclines au niveau cardiaque**

La doxorubicine et la daunorubicine entraînent la formation du radical superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyle quand elles sont incubées en présence de

microsomes et de mitochondries de cellules cardiaques provenant de différents animaux (67-70).

Le site majeur de la formation des radicaux oxygénés par les anthracyclines au niveau cardiaque est le complexe I de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, la NADH déshydrogénase (68). En effet:

- l'activité spécifique de réduction de la doxorubicine et de la production de l'anion superoxyde apparaît deux fois plus élevée au niveau des mitochondries cardiaques qu'au niveau des microsomes cardiaques (71)

- la cellule cardiaque est très riche en mitochondries (35% du volume total des cellules myocardiques comparés au 3,5% du système sarcoplasmique) et présente un rapport NADH/NADPH élevé (68)

In vivo, Floyd et coll. (71) ont mesuré la production du radical hydroxyle par la doxorubicine chez le rat au niveau de différents tissus, par la détection ( par chromatographie liquide haute pression et détection électrochimique) des produits de la réaction entre le salicylate et le radical hydroxyle, qui donnent des acides dihydroxybenzoïques (DHBAs). Après administration de doxorubicine et de salicylate, les auteurs constatent une augmentation préférentielle des DHBAs au niveau cardiaque et musculaire (multipliée par cent par rapport aux rats témoins), comparée au poumon (multipliée par trente), au cerveau et au sang (multipliée par 4).

### 1.3.2. La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique induite par les radicaux libres produits par les anthracyclines pourrait être à l'origine des altérations structurales observées au niveau des cellules cardiaques, après administration de l'anticancéreux : gonflement des mitochondries, dilatation et désintégration des membranes mitochondriales et microsomiales, désintégration des éléments contractiles et accumulation de nombreux pigments de type lipofuscine.

"In vitro", la doxorubicine produit une augmentation de la peroxydation lipidique lorsqu'elle est incubée en présence de mitochondries ou de microsomes hépatiques et cardiaques de différents animaux (35,72,73). Celle-ci est inhibée par ajout au milieu réactionnel de superoxyde dismutase, de chélateurs du fer ou de piègeurs du radical hydroxyle (35). De plus, la peroxydation lipidique induite par la doxorubicine est significativement plus élevée dans le cas d'organites provenant d'animaux nourris à l'aide d'un régime déficient en  $\alpha$  tocophérol (35,73).

"In vivo", des rat traités chroniquement par des doses cumulatives suffisantes de ce médicament pour le développement d'une cardiomyopathie, montrent au cours de l'analyse fluorimétrique d'extraits tissulaires une augmentation marquée des teneurs en

produits de la peroxydation lipidique (hydroperoxydes, endoperoxydes) de 40% au niveau cardiaque et de 10% au niveau hépatique (74).

Coudray et coll. (75) rapportent une augmentation significative de malondialdéhyde (MDA) chez des rats traités par la doxorubicine de façon chronique par rapport aux animaux témoins. De plus, des rats soumis à un régime déplété en sélénium présentent une sensibilité plus élevée à la toxicité cardiaque de la doxorubicine, qui pourrait s'expliquer par la baisse de l'activité de la glutathion peroxydase sélénodépendante dont l'activité dépend de la concentration en sélénium dans le milieu.

Enfin, "in vitro", la doxorubicine provoque l'oxydation des thiols protéiques qui cause l'inhibition de l'activité de la Ca ATPase au niveau de microsomes cardiaques de lapin et empêche la recapture du calcium par ceux-ci (76). L'inhibition de la Ca ATPase est levée par ajout de glutathion réduit, ce qui suggère que l'oxydation des groupements thiols de même que la désorganisation membranaire (et donc le relargage du calcium) provoquée par la peroxydation lipidique au niveau des mitochondries et des microsomes pourraient être responsables de l'augmentation en calcium intracellulaire observée lors de la cardiotoxicité des anthracyclines.

### **1.3.3. Protection par des agents antioxydants**

Des études ont été menées afin d'évaluer l'effet protecteur de différents agents piègeurs de radicaux libres ou de chélateurs du fer susceptibles d'inhiber la production de radicaux libres dépendante du fer par les anthracyclines.

#### 1.3.3.1. L' $\alpha$ -tocophérol ou vitamine E

Chez la souris, un prétraitement à l' $\alpha$ -tocophérol administré par voie intrapéritonéale avant l'injection d'une dose unique de doxorubicine permet de réduire la cardiotoxicité aiguë de l'anticancéreux. Il en résulte une diminution significative de la mortalité au quinzième jour (77).

Par contre, la vitamine E ne semble pas offrir une protection significative contre la cardiotoxicité chronique de la doxorubicine. Ainsi, des études réalisées sur le lapin (78) et le porc (79) ne montrent pas de différence significative concernant les lésions histologiques cardiaques entre les animaux supplémentés en vitamine E et les animaux témoins, après administration chronique de doxorubicine.

Chez l'homme, l'utilisation de vitamine E par voie orale donnant des taux sériques six à huit fois supérieurs à la normale, n'a pas provoqué d'amélioration substantielle de la cardiomyopathie induite par la doxorubicine puisque pour une dose totale de 550 mg/m<sup>2</sup>, la fréquence de décompensation cardiaque et les modifications histologiques observées après biopsie endomyocardique sont similaires à celle d'une population ne recevant que de la doxorubicine (80). Une autre étude effectuée sur des patients atteints

de leucémie myéloïde chronique et traités par de la doxorubicine n'a pas non plus montrée d'effet protecteur de la vitamine E sur la cardiotoxicité chronique de l'anticancéreux (81).

#### 1.3.3.2. L'acide ascorbique ou vitamine C

Chez la souris et le cobaye, un régime supplémenté en acide ascorbique permet de réduire la toxicité aiguë avec diminution de la mortalité, diminution des lésions cardiaques et diminution du taux des peroxydes lipidiques au niveau du sérum par rapport aux animaux témoins non supplémentés (82).

#### 1.3.3.3. La N-acétylcystéine

La N-acétylcystéine agit comme piègeur des radicaux libres grâce à son groupement thiol, et permet la détoxification du radical hydroxyle et des peroxyde lipidiques.

L'administration celle-ci permet une augmentation des concentrations en thiol nonprotéiques au niveau cardiaque ; or un prétraitement chez la souris avec du diéthylmaléate, qui diminue les teneurs en glutathion cellulaire augmente la cardiotoxicité aiguë de la doxorubicine (83). Si l'administration de N-acétyl cystéine permet de réduire la mortalité induite par une injection unique de doxorubicine chez la souris (83), elle ne diminue pas la cardiotoxicité chronique de l'anticancéreux lors d'une étude effectuée chez le chien (84).

#### 1.3.3.4. L'ICRF 187

L'ICRF 187 ou 1,2 bis(3,5-dicétopipérazinyl)propane est un dérivé non polaire de l'acide tétra-acétique éthylène diamine (EDTA), qui peut entrer dans la cellule myocardique et exercer une action protectrice en fonctionnant comme chélateur d'ions divalents, évitant la production de radicaux libres dépendante du fer.

L'expérimentation chez le chien (85), le lapin (86), la souris (87) montre qu'un prétraitement par l'ICRF 187 en intrapéritonéal avant chaque injection de doxorubicine entraîne un effet cardioprotecteur significatif sur la cardiotoxicité chronique de l'anticancéreux (objectivé par comparaison des lésions cardiaques par rapport aux animaux traités à la doxorubicine seule).

Une étude récente effectuée chez des femmes traitées pour un cancer du sein a aussi montré l'effet cardioprotecteur de l'ICRF 187 contre la cardiotoxicité chronique de la doxorubicine (88). Sur 150 femmes traitées par l'association 5-fluorouracile + cyclophosphamide + doxorubicine par voie intraveineuse tous les 21 jours, 76 patientes recevaient de l'ICRF 187 par la même voie (1mg/m<sup>2</sup>) avant injection de l'association. Une protection significative a été observée chez le groupe prétraité avec diminution de

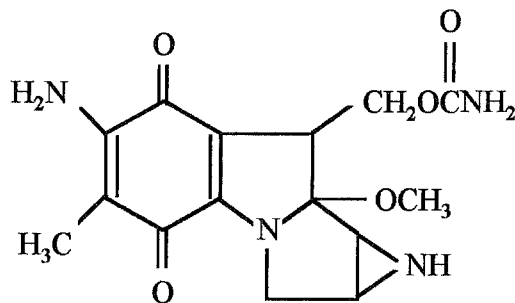
l'incidence des cardiomyopathies congestives et des lésions histologiques au niveau cardiaque. Les auteurs concluent que ces résultats positifs devront être confirmés par d'autres études cliniques, notamment chez des patients présentant des risques élevés au développement d'une cardiomyopathie (antécédent de myocardiopathie, traitements antérieurs par des anthracyclines).

Sur la base de l'effet cardioprotecteur de l'ICRF 187 chez l'homme et chez l'animal, et sur sa capacité à chélater le fer intracellulaire, la production de radicaux libres oxygénés dépendante du fer par les anthracyclines apparaît donc comme un mécanisme important dans la toxicité cardiaque de ces agents anticancéreux. Le fait que les piègeurs de radicaux libres tels que l' $\alpha$ -tocophérol n'aient pas montré d'effet cardioprotecteur semble aussi indiquer que la protection optimale est obtenue en empêchant la production de radicaux libres oxygénés par les anthracyclines plus que par leur détoxication.

## 2. La mitomycine C (AMETYCINE\*)

La mitomycine C est un antibiotique cytostatique isolé de *Streptomyces Caespitosus*.

Figure 15: Structure chimique de la mitomycine C.



La mitomycine C se comporte comme un agent alkylant mono ou bi-fonctionnel. Dans les conditions physiologiques, elle ne peut réagir avec l'ADN qu'après avoir été activée par réduction enzymatique des deux fonctions alkylantes, masquées dans la molécule initiale (groupe aziridine en C-1 et groupe carbamate en C-10). L'alkylation a lieu au niveau de l'atome N-6 de l'adénine et des atomes O-6 et N-2 de la guanine, avec formation de ponts intracaténaire et intercaténaire (3).

Les indications de la mitomycine C sont essentiellement palliatives:

- cancer de l'estomac et du pancréas (en association).
- cancer du sein.
- cancer de l'oesophage.

La toxicité aiguë est essentiellement hématologique et est habituellement retardée avec une récupération en six à huit semaines.

La toxicité chronique, rarement observée, peut se manifester par une microangiopathie thrombotique avec atteinte rénale, une fibrose pulmonaire très rare, une leucémie (1).

## **2.1. Mitomycine C et production de radicaux libres**

### **2.1.1. Formation du radical semi-quinone**

Lown et coll. (89) ont tout d'abord mis en évidence au moyen de la RPE la formation d'un radical semi-quinone lors de la réduction chimique (borohydrure de sodium) de la mitomycine C en condition aérobie. Kalyanaraman et coll. (90) observent par RPE la formation d'un radical semi-quinone lors de l'incubation de la mitomycine C avec des microsomes hépatiques de rat et du NADPH en conditions anaérobies.

Depuis, plusieurs travaux ont montré que la mitomycine C forme par réduction à un électron catalysée par la NADPH cytochrome P-450 réductase, par la NADH déhydrogénase et par la xanthine oxydase un radical semi-quinone (91-95).

La réduction à deux électrons, catalysée par la DT diaphorase, conduit à la formation de l'hydroquinone correspondante.

### **2.1.2. Formation du radical superoxyde et du radical hydroxyle**

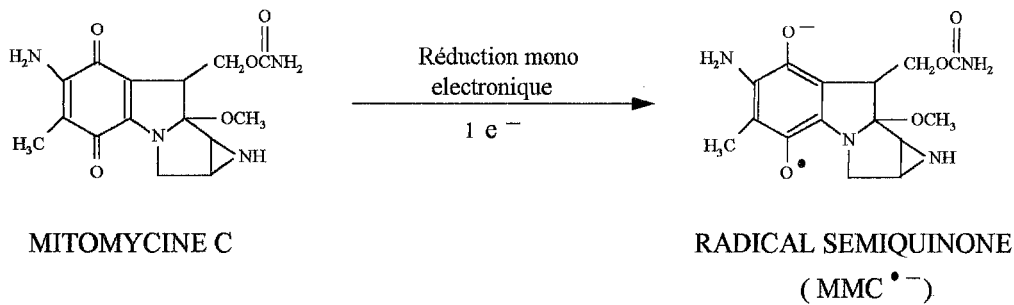
En aérobiose, le radical semi-quinone est capable de transférer, un électron à l'oxygène moléculaire pour former le radical superoxyde. Ainsi plusieurs études par RPE ont montré la formation du radical superoxyde et du radical hydroxyle lors de la réduction monoélectronique de la mitomycine C (89,93). De plus, la superoxyde dismutase, la catalase, les chélateurs du fer empêchent la formation du radical hydroxyle, suggérant donc que celui-ci est formé à partir de l'anion superoxyde selon un processus dépendant du fer.

Gutteridge et coll. (94) ont montré que la dégradation du désoxyribose, en présence de mitomycine C et d'un système réducteur xanthine/xanthine oxydase est augmentée sous de faibles concentrations en oxygène, lors d'une réaction qui est inhibée par la catalase, la SOD, et les piègeurs du radical hydroxyle, ainsi que par des chélateurs du fer tels que la desferrioxamine. Les auteurs suggèrent que le radical hydroxyle peut-être formé lors d'une réaction du type de celle de Fenton, le fer ferrique étant réduit en fer ferreux par

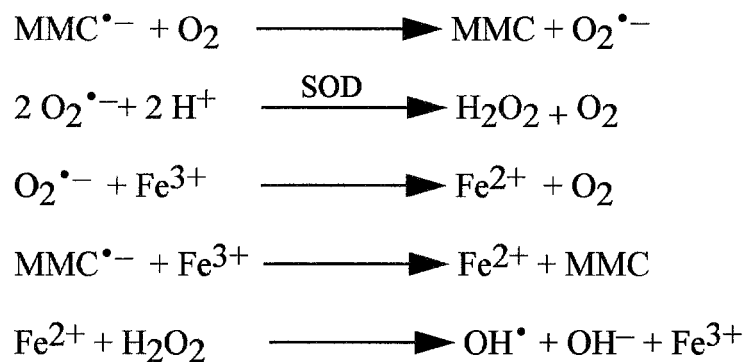


le radical semiquinone et où le peroxyde d'hydrogène provient de la dismutation de l'anion superoxyde.

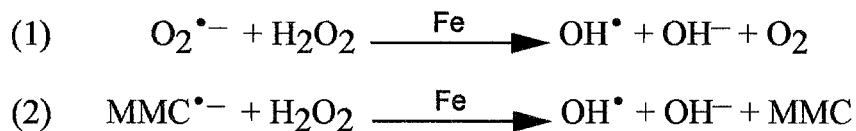
**Figure 16:** Formation de radicaux libres oxygénés par la mitomycine C. D'après Gutteridge et coll. (94) et Pan et coll. (91).



L'ensemble des réactions mises en jeu ensuite est le suivant:



La réaction globale est également écrite par Gutteridge et coll. (94) sous les deux formes suivantes:



La réaction (1) "indirecte" serait prédominante en aérobiose, et la réaction (2) "directe" serait augmentée en présence de faibles concentrations en oxygène. Cependant, la réaction (2) suppose la production de radicaux oxygénés fournissant le peroxyde d'hydrogène et stimulée par la semi-quinone.

## 2.2. Cytotoxicité de la mitomycine C et radicaux libres

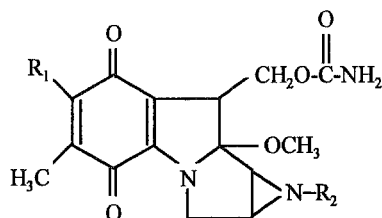
Outre ses propriétés alkylantes, la mitomycine C pourrait agir au niveau de l'ADN par la production de radicaux libres oxygénés, en particulier le radical hydroxyle. D'autant que, contrairement aux anthracyclines, elle peut être réduite et produire le radical superoxyde lorsqu'elle est liée à l'ADN (89).

"In vitro", la mitomycine C, en présence de NADPH cytochrome P-450 réductase et de fer ferrique induit des cassures de brins au niveau de l'ADN. La réaction est complètement inhibée par un piègeur du radical hydroxyle (benzoate de sodium), mais l'est très faiblement par la superoxyde dismutase ce qui suggère que le radical hydroxyle est l'espèce principale impliquée dans la dégradation de l'ADN (95).

In vitro, la superoxyde dismutase, la catalase, des chélateurs du fer et des piègeurs du radical hydroxyle réduisent significativement la cytotoxicité de la mitomycine C envers les cellules tumorales d'Ehrlich (49).

Afin d'évaluer le rôle des radicaux libres oxygénés dans l'activité antitumorale de la mitomycine C, Pristos et coll. (95) ont réalisé des études avec des analogues de la mitomycine C (porfiromycine, BMY 25282, BL 6783).

**Figure 17** : Analogues structuraux de la mitomycine C.



<u>Composés</u>	<u>R1</u>	<u>R2</u>
Mitomycine	-NH <sub>2</sub>	H
Porfiromycine	-NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
BMY-25282	-N=CH—N	H
BL-6783	-N=CH—N	CH <sub>3</sub>

BMY25282 et BL6783 sont plus facilement réduits que la mitomycine C en radical semiquinone et produisent plus de radicaux superoxyde et hydroxyle en aérobie. Or, ces deux composés sont nettement plus cytotoxiques que la mitomycine C envers les cellules tumorales murines EMT6 en normoxie, la différence étant minime envers les cellules en hypoxie. La porfiromycine, qui ne subirait pas de cycle rédox et ne produirait pas de radicaux hydroxyle, présente une cytotoxicité équivalente à la celle de la mitomycine C envers les cellules en hypoxie, mais est significativement moins toxique envers les cellules en normoxie. En outre, le diéthylldithiocarbamate, un inhibiteur de la superoxyde dismutase, augmente la cytotoxicité de BMY 25282 envers les cellules tumorales en normoxie, mais n'a pas d'effet sur la toxicité de la porfiromycine (96).

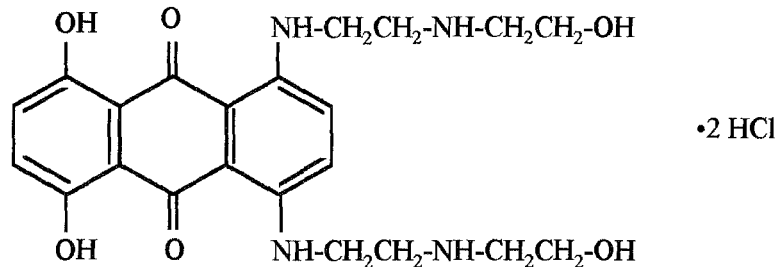
Il apparaît donc que la production de radicaux libres peut être impliquée dans la cytotoxicité de la mitomycine C, et de ses analogues. Par contre, le fait que la mitomycine C soit généralement plus cytotoxique envers les cellules hypoxiques qu'envers les cellules normoxiques n'est pas expliqué. De façon paradoxale, le taux de pontage interbrins induit par la mitomycine C est plus faible, et leur suppression plus rapide dans des conditions normoxiques qu'en hypoxie. De plus, des contreverses subsistent sur l'importance "in situ" de l'activation par les cytochromes P-450 réductases (réduction à un électron) par rapport à l'activation dépendante des DT-diaphorases (réduction à deux électrons). De récentes études suggèrent que les voies d'activation sont différentes en conditions aérobies et anaérobies (97).

En aérobie, la cytotoxicité de la mitomycine C serait médiée par la production de radicaux libres lors de la réduction monoélectronique de la drogue mais aussi par la production d'espèces alkylantes dérivées de l'hydroquinone ( formée lors de réduction à deux électrons du médicament), après élimination spontanée des groupements méthoxy et carbamyl et ouverture du cycle aziridine. Par contre, en anaérobiose, les DT-diaphorases ne joueraient aucun rôle, et la voie préférentielle serait la réduction monoélectronique de la mitomycine C avec production du radical semiquinone qui reste stable (absence d'oxygène accepteur d'électrons) et qui conduit, toujours par élimination des groupements méthoxy et carbamyl et ouverture du cycle aziridine, à la formation d'espèces alkylantes.

### 3. La mitoxantrone (NOVANTRONE\*)

La mitoxantrone est un agent anticancéreux de structure anthracène-dione, proche de celle des anthracyclines.

Figure 18: Structure chimique de la mitoxantrone.



L'aptitude de la mitoxantrone à s'intercaler dans l'ADN et à inhiber sa synthèse et celle des ARN messagers est bien établie (5). La position en 1 et 4 de fonctions alkyle pourrait être responsable de liaison interbrins et la mitoxantrone agirait aussi par inhibition de la topoisomérase II (1).

La première indication est représentée par le traitement des cancers du sein, essentiellement métastatiques. Dans le traitement des leucémies aiguës, lymphoïdes et myéloïdes, elle s'utilise en association.

Les effets toxiques aigus sont dépendants de la dose, et comprennent une myélosuppression qui est à l'origine d'une neutropénie réversible, ainsi que des nausées, vomissements et une mucite. Il existe une cardiotoxicité cumulative minime, apparaissant au delà de 120 mg/m<sup>2</sup> avec apparition de cardiomyopathies analogues à celles produites par les anthracyclines.

#### 3.1. Mitoxantrone et radicaux libres

La mitoxantrone s'est révélé un mauvais substrat pour les NADPH cytochromes-P450 réductases, comparé à la doxorubicine et à la daunorubicine (98). Cependant, quand elle est incubée en anaérobiose avec des microsomes hépatiques de rat en présence de NADPH, la mitoxantrone donne un radical semiquinone détecté par RPE (99). La production de radicaux superoxyde à partir du radical semiquinone en aérobie apparaît cependant très faible et ne semble pas en mesure d'induire une peroxydation lipidique au niveau de microsomes hépatiques et cardiaques (100). Il apparaît même que la mitoxantrone inhibe la peroxydation basale au niveau des mitochondries (100) et celle

induite par la doxorubicine au niveau de microsomes hépatiques (101). Cette inhibition pourrait s'expliquer par la formation d'un complexe bi-moléculaire de la mitoxantrone avec les groupements prosthétiques de la flavine mononucléotide (FMN) et de la flavine adénine dinucléotide (FAD) (102).

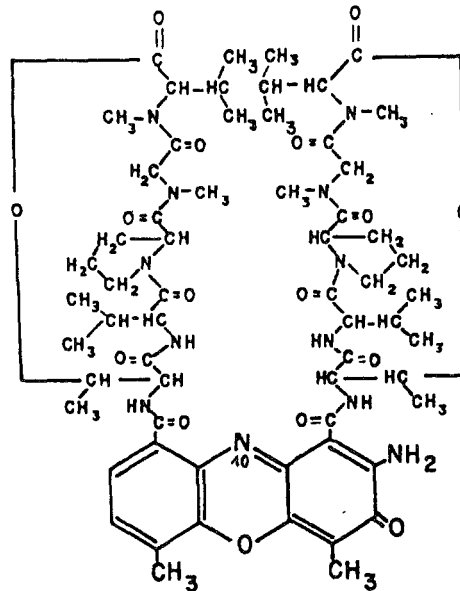
La faible aptitude de la mitoxantrone à produire des radicaux libres ainsi que sa capacité à inhiber la peroxydation lipidique au niveau des microsomes cardiaques pourraient expliquer sa faible cardiotoxicité par rapport aux anthracyclines (98).

Par contre, Fischer et coll. (103) ont montré qu'elle est un bon substrat pour les peroxydases (le modèle utilisé étant la peroxydase de raifort) qui en présence de peroxyde d'hydrogène entraîne la formation d'un radical mitoxantrone détecté par RPE. Ce radical (dont le site radicalaire n'a pas été identifié) apparaît différent du radical semiquinone et est capable d'induire des pontages au niveau de l'ADN. Selon les auteurs, l'activation de la mitoxantrone en une espèce radicalaire par des peroxydases telles que la prostaglandine endoperoxydase pourrait participer à l'activité cytotoxique de l'anticancéreux.

## 4. L'actinomycine D (LIOVAC\*)

L'actinomycine D possède une double chaîne pentapeptidique comportant la L thréonine, la D valine, la L proline et la L méthyl Valine.

**Figure 19:** Structure chimique de l'actinomycine D.



L'actinomycine D se lie par intercalation à l'ADN au niveau du cycle central phénoxazone, la fixation étant stabilisée par une liaison entre les pentapeptides et l'ADN.

Elle n'est employée qu'en association, essentiellement dans le traitement des tumeurs malignes pédiatriques et plus généralement des tumeurs malignes embryonnaires (néphroblastome, sarcome d'Ewing, certains carcinomes embryonnaires métastatiques). Les effets indésirables aigus sont dominés par la myélosuppression, les nausées et vomissements et la toxicité veineuse. Des mucites sévères sont parfois observés.

### 4.1. Actinomycine D et radicaux libres

L'actinomycine D produit une augmentation de la consommation en oxygène quand elle est incubée en présence de microsomes hépatiques de rat et du NADPH, ou de NADPH cytochrome P450 réductase et de NADPH avec formation d'une espèce



La bléomycine est classée comme agent scindant, elle crée des ruptures mono ou bi-caténaire au niveau de l'ADN impliquant une réaction dépendante de l'oxygène et du fer intracellulaire.

En tant que traitement curatif, elle est utilisée dans:

- des tumeurs germinales testiculaires ou extra gonadiques, en association,
- des lymphomes malins hodgkiniens, en association,
- des lymphomes malins non hogkiniens, en association.

En traitement palliatif, elle est utilisée dans le traitement:

- des carcinomes épidermoïdes de la sphère oto-rhino-laryngologique, de l'oesophage, du poumon, du pénis, du col utérin, du canal anal, en association,
- dans le cancer de la vessie,
- dans le sarcome de Kaposi.

La toxicité aiguë la plus fréquemment observée est l'apparition d'une fièvre, s'accompagnant de frissons. Plus rarement se produit un urticaire, un bronchospasme ou un syndrome de Reynaud. La toxicité hématologique est nulle ou très faible.

La toxicité chronique est cutanée et pulmonaire. La toxicité cutanée se caractérise par un érythème, un épaissement et une hyperpigmentation cutanée. Mais la complication la plus sérieuse à long terme du traitement à la bléomycine est la toxicité pulmonaire qui se manifeste par une fibrose pulmonaire interstitielle. La fréquence d'apparition des pneumonies et des fibroses varie selon les auteurs, de 10 à 40% avec une fibrose pulmonaire fatale chez 1% des patients (119).

Les symptômes apparaissent un à trois mois après le début de la thérapie et sont les mêmes que ceux de toute fibrose pulmonaire avec toux non productive, dyspnée d'effort évoluant rapidement en tachypnée au repos et fièvre.

Sur le plan histologique, on note un oedème interstitiel et fibrineux autour des sacs alvéolaires, la formation de membranes hyalines à la surface des cellules du revêtement de la paroi alvéolaire, un épaissement des parois alvéolaires avec apparition de fibres de collagène et de fibroblastes. De plus, il se produit une prolifération des cellules épithéliales de type II et de macrophages au niveau des espaces alvéolaires, ainsi qu'une nécrose des cellules épithéliales de type I (119).

Les facteurs de risque du développement de la fibrose sont l'âge (risques accrus à partir de 70 ans), une maladie pulmonaire ou rénale préexistante, une irradiation thoracique et l'exposition à de fortes concentrations en oxygène durant l'anesthésie.

### **5.1. Cytotoxicité de la bléomycine et radicaux libres**

La coupure de l'ADN par la bléomycine est couramment considérée comme résultant d'une action en plusieurs phases avec:



- fixation de la bléomycine sur l'ADN,
- complexation bléomycine-Fer,
- attaque de l'ADN par des espèces réactives oxygénées issues de l'activation du complexe ternaire bléomycine-fer-O<sub>2</sub>.

### **5.1.1. Fixation bléomycine-ADN**

La spectroscopie en résonance magnétique nucléaire réalisée sur la bléomycine seule, puis sur la bléomycine en présence d'ADN, et la comparaison des constantes d'affinité ADN-bléomycine et ADN tripeptide S ont montré que la bléomycine se fixe sur l'ADN par son peptide S (au niveau de la fonction bithiazole), préférentiellement au niveau de la guanine (107). L'amine terminale facilite la liaison de la bléomycine à l'ADN.

### **5.1.2. Formation du complexe bléomycine-Fer**

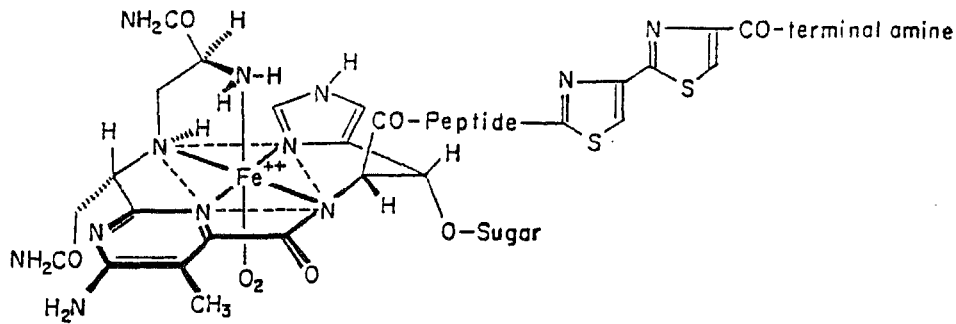
La bléomycine forme des complexes 1:1 avec différents métaux tels que le cuivre, le nickel, le zinc, le cobalt et le fer (108). Le complexe cuivrique ne dégrade pas l'ADN "in vitro", alors qu'il en est capable "in vivo" sur des cultures de cellules et chez l'animal (109). Il apparaît que le complexe cuivrique est réduit au niveau de la cellule et libère la bléomycine qui se complexe alors avec le fer (108).

C'est sous sa forme complexée avec le fer que la bléomycine va agir au niveau de l'ADN. Sausville et coll. (110) ont montré que les ions Fe(II) et Fe(III) stimulent la dégradation de l'ADN par la bléomycine, le degré d'oxydation du fer n'étant pas indifférent. Le système bléomycine Fe(II) agit directement en présence d'oxygène moléculaire, tandis que le complexe bléomycine-Fe(III) à besoin d'un réducteur en plus pour être actif. La substitution de Fe(II) par d'autres métaux, ou l'ajout d'agents chélateurs du fer inhibent l'action de la bléomycine sur l'ADN (110).

### **5.1.3. Activation du complexe bléomycine-fer et dégradation de l'ADN**

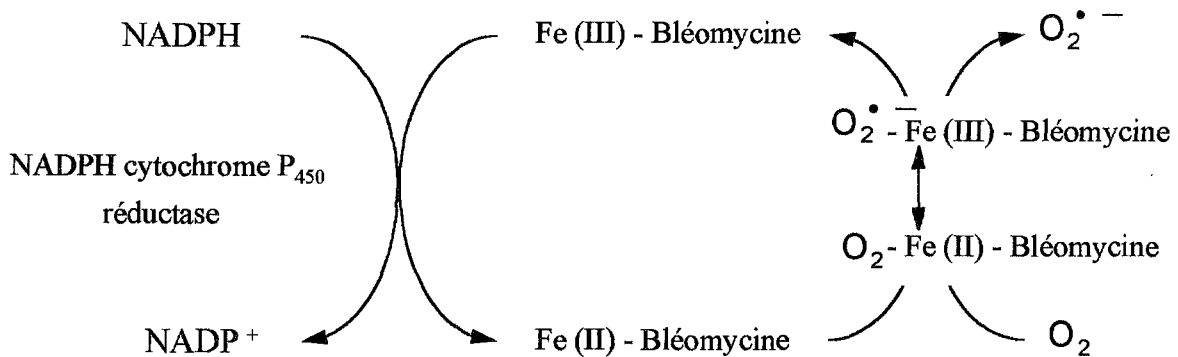
La dégradation de l'ADN semble liée à la formation d'espèces réactives oxygénées, résultant de l'interaction du complexe bléomycine-fer avec l'oxygène moléculaire, et de la formation d'un complexe ternaire bléomycine-Fer-O<sub>2</sub> (109-111).

**Figure 21:** Structure du complexe bléomycine-Fe(II)-O<sub>2</sub> (109).



Siguira et coll. (112) ont mis en évidence, par RPE, la formation du radical superoxyde et du radical hydroxyle par le complexe bléomycine-Fe(II), en présence d'oxygène moléculaire. La réduction du complexe bléomycine-Fe(III), en aérobiose, par la cytochrome P-450 réductase isolée de microsomes hépatiques de rat conduit effectivement à la formation du radical superoxyde et du radical hydroxyle (conférez figure 22) (113).

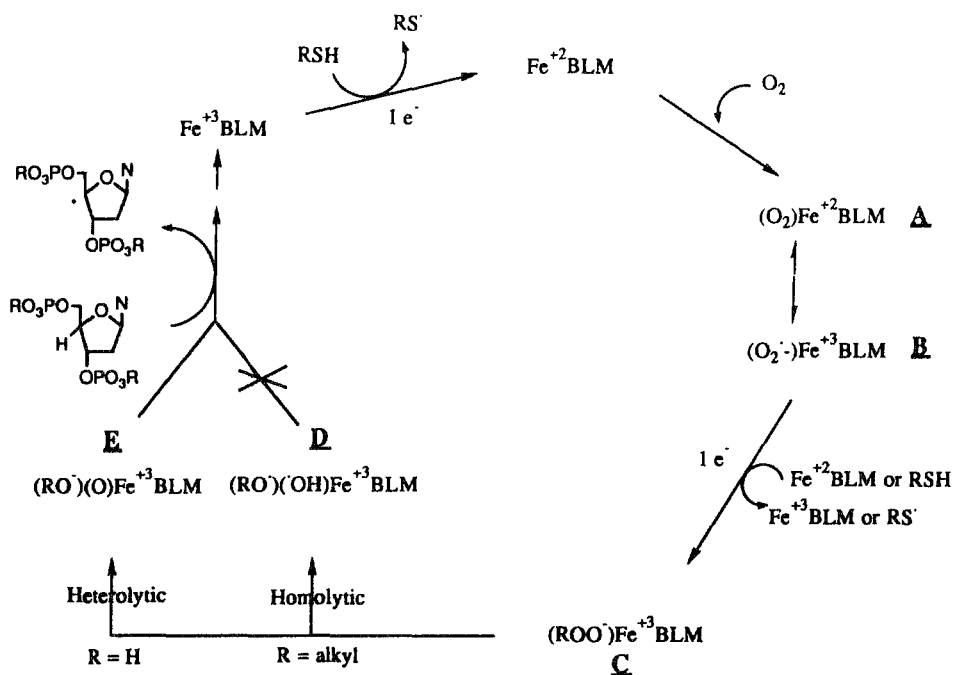
**Figure 22:** Cycle rédox du complexe bléomycine Fe (III) catalysé par la NADPH cytochrome P-450 réductase (113).



Le début de la dégradation de l'ADN par la bléomycine activée se fait par arrachement d'un atome d'hydrogène sur le carbone en 4' du désoxyribose créant à ce niveau un site radicalaire (114). La forme exacte de l'espèce oxygénée, issue de l'activation du complexe bléomycine-Fe-O<sub>2</sub> et responsable de l'arrachement de l'hydrogène donne

encore matière à controverse. Dedon et Goldberg (111) ont proposé un mécanisme pour expliquer l'activation de la bléomycine.

**Figure 23:** Activation du complexe bléomycine-Fe-O<sub>2</sub> (BLM-Fe-O<sub>2</sub>). D'après Dedon et Goldberg (111).



Dans ce système, l'oxygène moléculaire se combine avec le complexe bléomycine-Fe(II), issu de la réduction monoélectronique du complexe ferrique par des systèmes enzymatiques (NADPH cytochrome P450 réductase) ou par des composés réducteurs (composés à groupement thiol) pour donner un complexe ternaire bléomycine-Fe(II)-O<sub>2</sub> (A), en équilibre avec le complexe bléomycine-Fe(III)-O<sub>2</sub><sup>-</sup> (B).

Ce complexe subit une réduction à un électron (par un autre complexe bléomycine-Fe(II) ou par des composés à groupement thiol=RSH), pour donner la bléomycine activée (C), dont l'apparition correspond à la production de dommages à l'ADN. Le complexe activé de la bléomycine (C) possède les caractéristiques d'un complexe bléomycine-Fer-peroxyde.

Les espèces attaquant l'ADN pourraient donc résulter du clivage homolytique ou hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde. Cependant il apparaît que l'espèce (D), pouvant libérer le radical hydroxyle et provenant de la rupture homolytique du

peroxyde.

peroxyde ne serait pas responsable de la dégradation de l'ADN, et ceci pour les raisons suivantes:

- l'attaque sélective de la bléomycine sur l'hydrogène C4' du désoxyribose (114).
- la quantité minime de produits résultant de l'attaque du radical hydroxyle sur les bases (par exemple la 8-hydroxyguanosine) après dégradation de l'ADN par la bléomycine (115).

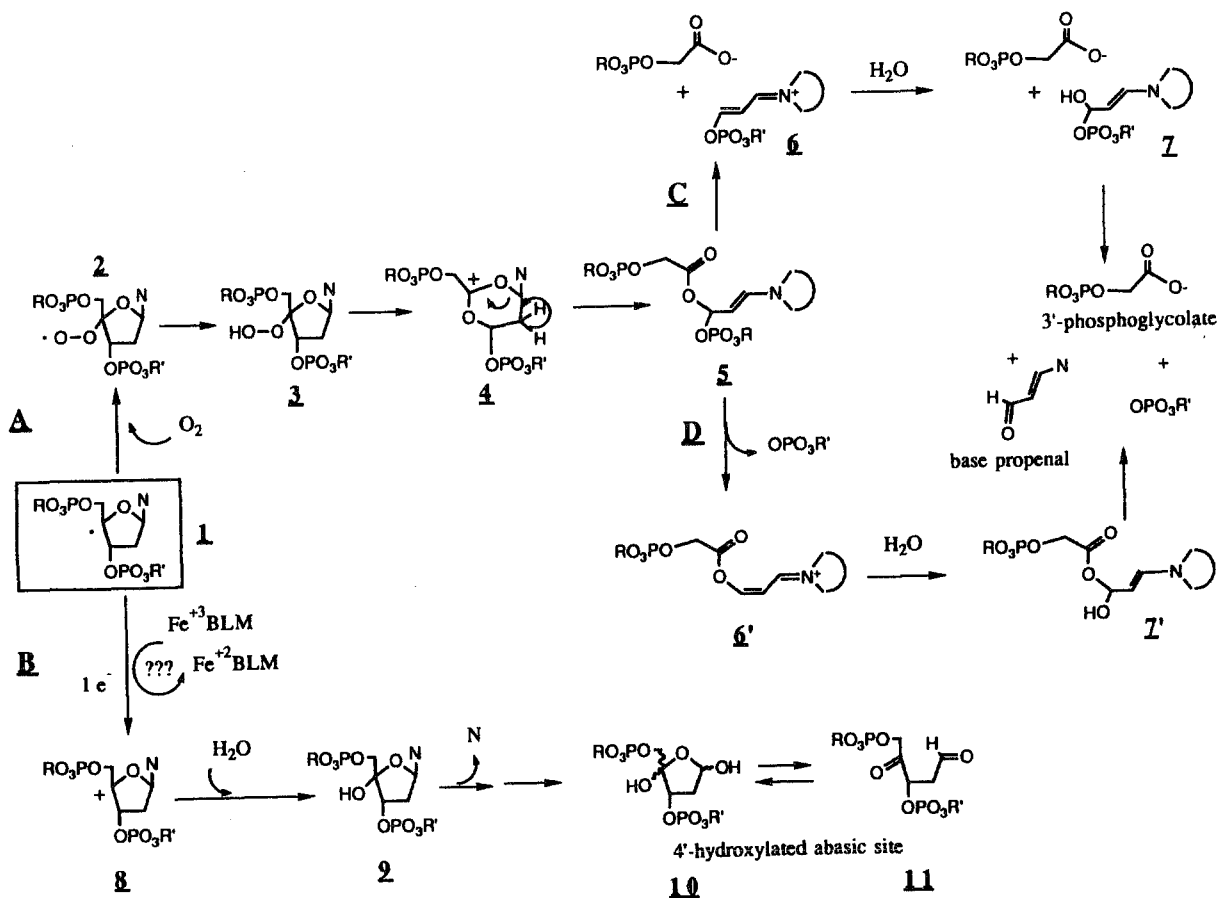
Nous noterons cependant que la dégradation du désoxyribose est une réaction classique du radical hydroxyle. L'espèce impliquée dans l'arrachement de l'hydrogène pourrait être une espèce perferryl (E) issue du clivage hétérolytique du peroxyde de la bléomycine activée.

Les produits terminaux de la dégradation de l'ADN sont:

- des bases libres.
- des bases propenals, réagissant à l'acide thiobarbiturique.
- du 3' phosphoglycolate.

A partir du radical centré en C4' du désoxyribose, deux voies de dégradation sont possibles (111):

**Figure 24:** Dégradation du désoxyribose après attaque par le complexe bléomycine-Fe-O<sub>2</sub> activé. D'après Dedon et Goldberg (111).



La voie A: où le désoxyribose, ayant subi un réarrangement moléculaire rompt la liaison O-C1' par suppression rapide d'un hydrogène en C2' aboutissant à la libération de base-propenal et de 3' phosphoglycolate. La voie B: aboutissant à la libération de bases libres. Le radical en C4' est oxydé pour donner un ion carbonium, rapidement hydroxylé par addition d'eau. L'hydroxylation pourrait aussi provenir de l'addition en C4' d'un radical hydroxyle. La libération de la base aboutit à la formation d'un sucre hydroxylé, possédant un site abasique labile donnant à l'équilibre une structure cétonique labile.

L'attaque du désoxyribose en C4' aboutit à la formation de cassures simples et doubles brins au niveau de la chaîne d'ADN, et serait le mécanisme majeur de la cytotoxicité de la bléomycine (111).

## **5.2. Toxicité pulmonaire de la bléomycine et radicaux libres**

Les espèces réactives oxygénées produites par la bléomycine activée telles que le radical superoxyde, le radical hydroxyle et probablement les espèces perferryls pourraient être aussi impliquées dans la toxicité pulmonaire de la bléomycine.

Les modifications histologiques au niveau pulmonaire observées après traitement à la bléomycine sont similaires à celles induites par l'exposition à de fortes concentrations en oxygène or, il apparaît que l'atteinte pulmonaire lors de l'hyperoxie est médiée par la production de radicaux libres oxygénés (116). Par ailleurs l'hyperoxie potentialise la toxicité pulmonaire de la bléomycine chez l'homme et chez l'animal (116) de même que l'administration chez la souris de fer ferrique par voie intratrachéale (117). En outre, Nakamu et coll (118) observent une nette augmentation de la toxicité pulmonaire de la bléomycine (épaississement des parois alvéolaires, apparition d'une fibrose) chez des hamsters soumis à un régime déplété en vitamine E, avec l'apparition de lésions emphysémateuses non présentes chez les animaux témoins. Enfin, Filderman et coll. (120) observent au niveau pulmonaire une augmentation significative des teneurs en catalase, glutathion peroxydase et glutathion réductase chez des souris traitées de façon chronique par des doses fibrogéniques de bléomycine. Les mêmes observations sont notées chez le hamster après administration intratrachéale de bléomycine (121).

### **5.2.1. Peroxydation lipidique**

Le complexe bléomycine-Fe(II) induit en aérobiose la peroxydation lipidique des membranes cytoplasmiques de cellules KB3 entraînant une perturbation de leur fluidité (122). Cette peroxydation n'est pas observée en présence de piègeurs du radical hydroxyle, de chélateurs du fer ou lors de l'utilisation séparée de bléomycine et de fer

ferreux. Le complexe bléomycine-Fe(III) pourrait induire une peroxydation des acides gras insaturés, selon un modèle d'action proche de celui de la lipooxygénase, par arrachement d'un hydrogène (123).

"In vivo", Giri et coll. (121) ont aussi mis en évidence une nette augmentation de la peroxydation lipidique au niveau pulmonaire chez des hamsters traités par la bléomycine par voie intratrachéale, corrélée à une augmentation du contenu en collagène pulmonaire. De même, Chandler et coll (124) observent chez des hamsters traités par la bléomycine par voie intratrachéal une augmentation de celle-ci et de la teneur en collagène pulmonaire, qui est fortement diminuée si on utilise des animaux déplétés en fer (au moyen de saignements via le sinus rétro-orbital et d'un régime sans fer).

Passero et coll. (125) ont montré "in vitro", que la peroxydation de l'acide arachidonique par le complexe bléomycine-Fe(II) aboutit à la formation de produits hautement chimiotactiques pour les leucocytes tels que l'acide hydroxyperoxyeicosatétraoïque (HPETE). Ces produits pourraient être responsables de l'initiation de la réponse inflammatoire observée au cours de l'atteinte pulmonaire par la bléomycine, et en rentrant dans la voie de la lipooxygénase produirait d'autres espèces radicalaires. De plus, "in vivo" la bléomycine administrée en instillation intratrachéale à des rats induit l'activation des macrophages alvéolaires avec libération de cytokines (126). Enfin, Sollman et coll. (127) ont montré que l'injection systémique de bléomycine chez le rat augmente la production d'anions superoxyde par les monocytes-macrophages alvéolaires et observent par rapport aux animaux témoins une accumulation de polynucléaires dans les capillaires pulmonaires et la présence peu habituelle d'eosinophiles. Selon les auteurs, la production d'anions superoxyde médiée par les monocytes-macrophages pourrait jouer un rôle important dans les premiers stades de la toxicité pulmonaire de la bléomycine, via le processus de la peroxydation lipidique.

### 5.2.2. La bléomycine hydrolase

La toxicité sélective de la bléomycine pour les poumons et la peau pourrait s'expliquer par la diminution à ce niveau de l'activité d'une enzyme, la bléomycine-hydrolase. L'activité biologique de la bléomycine est dépendante de la présence d'un groupement carboxyamide dans la moitié  $\beta$ -aminoalanine. L'hydrolyse de la liaison, catalysée par la bléomycine-hydrolase donne la désamidobléomycine, qui possède un groupe  $\beta$ -amino plus basique au niveau de la  $\beta$ -aminoalanine, et à pH physiologique, le groupe acide carboxylique de la désamidobléomycine occupe alors le cinquième site de coordination du complexe bléomycine-Fe(II). Il en résulte pour la molécule hydrolysée une diminution considérable de l'aptitude de lier l'oxygène moléculaire, et donc de produire des espèces réactives oxygénées (128).

Pour les mêmes doses injectées par voie sous-cutanée, la bléomycine induit chez des souris une fibrose pulmonaire alors que la désamidobléomycine n'entraîne aucune atteinte pulmonaire (129). Une étude effectuée chez cet animal a effectivement montré une teneur faible en bléomycine hydrolase au niveau de la peau et des poumons, comparés au foie, au rein et à la moelle épinière et certaines lignées de lapins et de souris présentant une sensibilité augmentée à la toxicité pulmonaire de la bléomycine possèdent des taux très faibles en bléomycine hydrolase (129).

Enfin, l'administration systémique et chronique de la bléomycine à des doses fibrogéniques entraîne une nette diminution de l'activité de la bléomycine hydrolase (moins 40% après trois semaines) (120).

### **5.2.3. Protection par des agents anti-oxydants**

Des études ont été menées chez l'animal afin d'évaluer l'effet des antioxydants et des chélateurs du fer sur la toxicité pulmonaire de la bléomycine.

#### 5.2.3.1. L' $\alpha$ -tocophérol ou vitamine E

Nous avons souligné précédemment que des hamsters déplétés en vitamine E présentaient une susceptibilité augmentée à la toxicité pulmonaire de la bléomycine.

Par contre, des souris nourries par un régime enrichi en vitamine E et possédant des taux sériques en  $\alpha$ -tocophérol trois fois supérieurs à ceux des animaux témoins présentent une sensibilité équivalente à la toxicité pulmonaire de la bléomycine administrée par voie intraveineuse (130).

#### 5.2.3.2. Le diméthylsulfoxyde

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un piègeur sélectif des radicaux hydroxyle. Si Pépin et coll. (131) décrivent une protection du DMSO chez des rats ayant reçu de la bléomycine en instillation intratrachéale (diminution de la survenue d'hémorragies pulmonaires et diminution de l'intensité de la fibrose pulmonaire aiguë), Haschek et coll. (132) observent une nette potentialisation de la mortalité corrélée à une augmentation du contenu en collagène pulmonaire chez le rat et la souris traités par voie intrapéritonéale aux mêmes doses de DMSO que précédemment, mais après administration systémique de bléomycine.

#### 5.2.3.3. La N-acétyl-cystéine

L'administration en continu et en injection sous cutanée de N-acétyl cystéine chez le rat traité par la bléomycine par voie intratrachéale n'a pas montré d'effet protecteur objectivé par comparaison des lésions histologiques au niveau pulmonaire par rapport

aux animaux témoins (133). Par contre un prétraitement à la N-acétyl cystéine par voie orale chez la souris avant l'administration de bléomycine (voie intratrachéale) permet une nette réduction du contenu en collagène pulmonaire par rapport aux animaux traités par la bléomycine seule (134).

#### 5.2.3.4. La déferoxamine

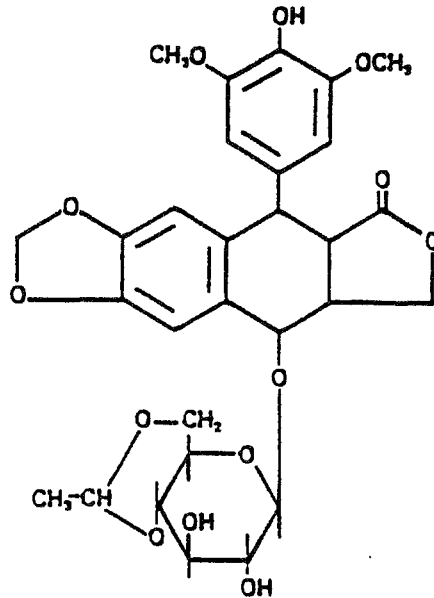
La déferoxamine est un chélateur spécifique du fer ferrique. Chez le hamster, un prétraitement par la déferoxamine, puis l'injection journalière de ce produit après administration intratrachéale de bléomycine a permis une réduction significative de la fibrose et de la peroxydation lipidique observées au niveau pulmonaire (135). Ceci confirme le rôle important du fer dans le mode d'action de la bléomycine. Cependant chez le rat, l'injection journalière de déferoxamine n'a pas permis de diminuer la réponse inflammatoire et la fibrose induites au niveau pulmonaire par l'instillation intratrachéale de bléomycine (136). Selon les auteurs, la divergence entre ces résultats pourrait s'expliquer par l'incapacité de la déferoxamine à pénétrer dans la cellule, son mode d'action étant limité au milieu extracellulaire. Par contre, pour des raisons inexplicées, l'ICRF 187 qui agit aussi au niveau intracellulaire potentialise la toxicité pulmonaire de la bléomycine chez le rat. (137). L'utilisation d'une nouvelle génération d'agents chélateurs du fer, tels que les hydroxypyridones ou les hydroxypyrones pourra peut-être apporter une protection contre la toxicité pulmonaire de la bléomycine.



## 6. L'étoposide ou VP16 (VEPESID\*)

L'étoposide est un dérivé hémisynthétique des podophyllotoxines, substances naturelles isolées de *Phodophyllum Peltatum*.

Figure 25: Structure chimique de l'étoposide.



Contrairement à la podophylline dont il dérive et bien qu'il soit un agent tubulo-affin, il n'inhibe pas l'assemblage des microtubules et n'est donc pas un antimitotique vrai. Il provoque un retard de la progression du cycle cellulaire en phase S et un arrêt de celle-ci en fin de phase S ou au début de la phase G2 (1). De plus, l'étoposide induit des cassures simples ou doubles brins sur l'ADN, et agirait aussi par le biais de la topoisomérase II (5).

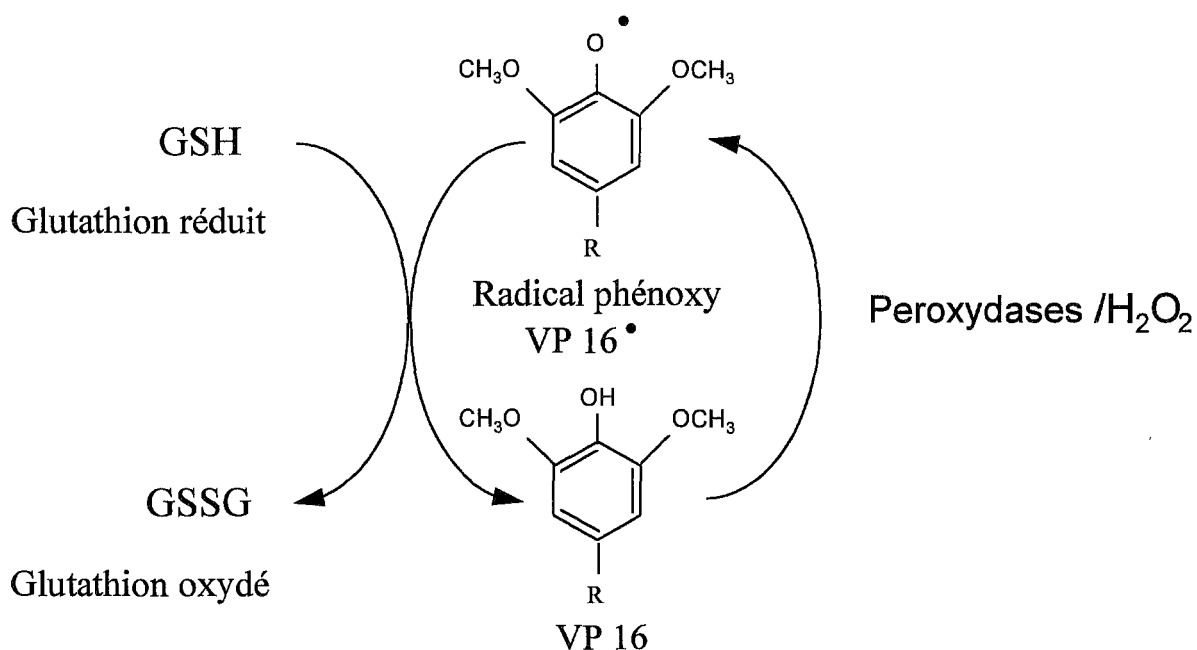
En traitement curatif, il est utilisé en association dans les cancers embryonnaires testiculaires et extragonadiques, dans les lymphomes malins hodgkiniens et non-hodgkiniens et dans les leucémies aiguës. Comme palliatif, toujours en association, il est utilisé dans le cancer du poumon à petites cellules et dans le sarcome de Kaposi associé au syndrome d'immuno déficience acquise (SIDA).

La toxicité habituelle est hématologique, et son intensité est proportionnelle à la dose. Les toxicités muqueuses, digestives et capillaires sont habituellement peu marquées.

## 6.1. Etoposide et radicaux libres

Sinha et coll. (138) ont montré, en utilisant la peroxydase de raifort que ce type d'enzyme, en présence de peroxyde d'hydrogène catalyse la réduction monoélectronique de l'étoposide (VP16) en un radical phénoxy (VP16<sup>•</sup>). Contrairement au radical semiquinone de l'anthracycline, le radical phénoxy ne réagit pas avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux libres oxygénés. Il ne se lie pas à l'ADN et aux protéines, mais réagit avec les groupements thiol et provoque leur oxydation (47). Ainsi, "in vitro", le glutathion réduit rapidement le radical phénoxy (VP16<sup>•</sup>) en étoposide, et est donc oxydé lors de la réaction. Sinha (47) suggère que la déplétion du glutathion réduit (qui joue un rôle important dans la détoxification des intermédiaires réactifs, radicaux libres et substances électrophiles) pourrait contribuer "in vivo" à l'activité antitumorale de l'étoposide.

**Figure 26:** Réduction de l'étoposide par les systèmes peroxydase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et interaction avec le glutathion. D'après Sinha (47).



L'étoposide, incubé avec des microsomes hépatiques de rat, subit une O-déméthylation cytochrome P-450-dépendante, aboutissant à la formation de métabolites qui se lient de façon covalente et irréversible aux protéines et à l'ADN. Haim et coll. (139) ont identifié ces métabolites par chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse, il s'agit des produits représentés sur la figure 27, c'est à dire:

- d'un dérivé dihydroxylé en 3' et 4' (DHVP16),
- d'un dérivé orthoquinonique (VP16Q),
- d'un radical semiquinonique (VP16SQ).

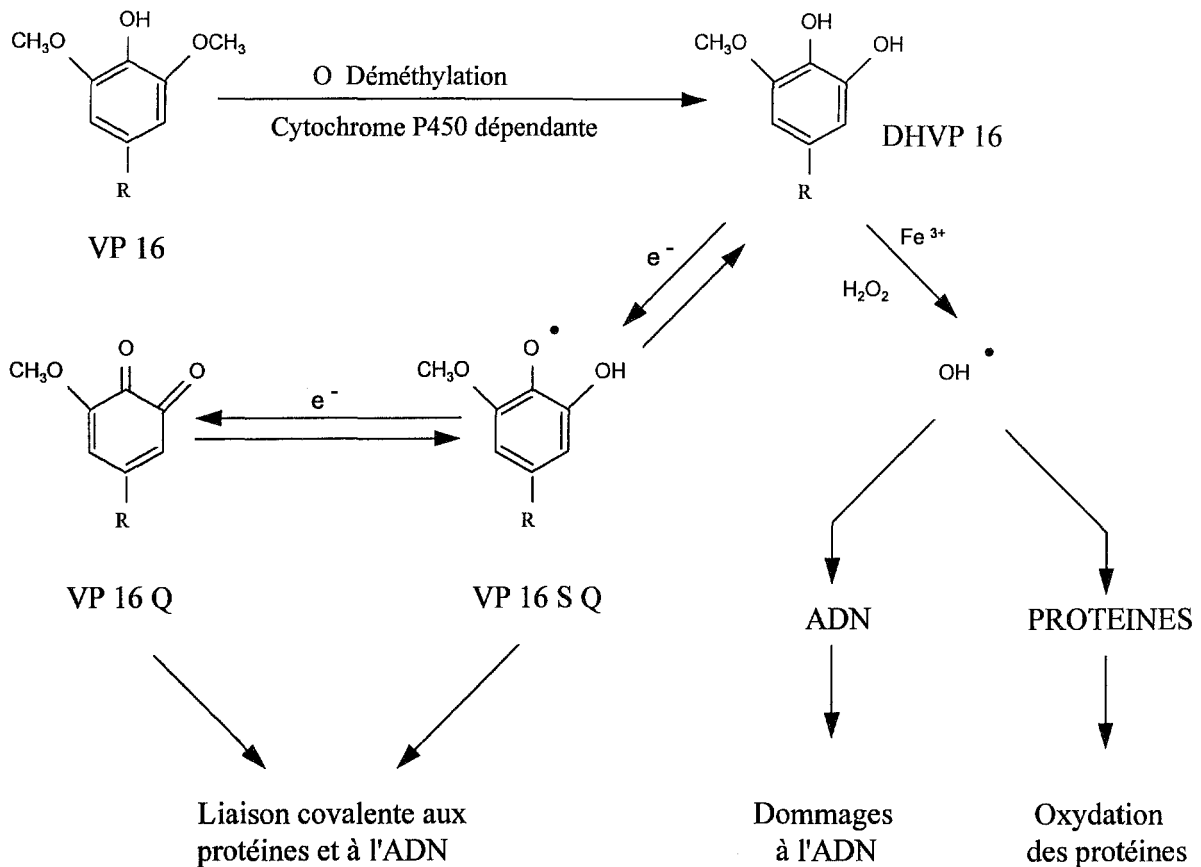
Il apparaît que le DHVP16 et le VP16Q peuvent donner, respectivement par réduction et oxydation le dérivé semiquinonique (139). De plus, l' O-déméthylation de l'étoposide peut être aussi catalysée par des systèmes peroxydasiques tel que la myéloperoxydase ou la prostaglandine synthétase (140-142).

Le dérivé dihydroxylé (DHVP16) ne se lie pas à l'ADN ou aux protéines, mais peut former un chélate stable avec le fer ferrique, qui catalyse alors la production du radical hydroxyle en présence de peroxyde d'hydrogène. Dans ces conditions, le complexe DHVP16-Fe(III) induit "in vitro" des coupures au niveau de la chaîne d'ADN, le DHVP16 ou le fer ferrique utilisé seul, en présence de peroxyde d'hydrogène, n'ayant aucun effet (141).

Le dérivé orthoquinonique et le dérivé semiquinonique se lient de façon covalente à l'ADN et aux protéines, et sont capables "in vitro", d'inactiver la réplication simple et double brin d'ADN de bactériophages (142).

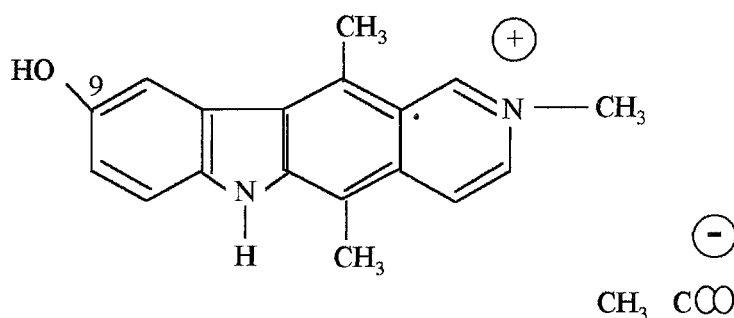
Les dérivés radicalaires de l'étoposide ainsi que les radicaux hydroxyle produits par le dérivé dihydroxylé en présence de fer pourraient donc contribuer "in vivo" à la cytotoxicité de l'étoposide. Cependant, le métabolisme de l'étoposide "in vivo" demeure encore largement inconnu.

**Figure 27:** Production d'espèces radicalaires lors de l'activation de l'étoposide et leurs implications possibles dans la cytotoxicité de cet agent anticancéreux. D'après Sinha (47) et Haim et coll. (139).



## 7. L'elliptinium (CELIPTIUM\*)

Parmi les nombreuses ellipticines tout d'abord isolées des plantes du genre *Ochrosia*, puis obtenues par hémisynthèse ou synthèse totale, une seule est actuellement utilisée en thérapeutique, l'elliptinium ou acétate de N2-méthyl-9-hydroxyellipticinium.

**Figure 28:** Structure chimique de l'elliptinium.

L'elliptinium est à l'origine d'une liaison intercalante avec l'ADN, et de cassures au niveau de l'ADN par interaction avec la topoisomérase II (5).

Les cancers métastatiques du sein constituent sa principale indication.

L'elliptinium peut provoquer une toxicité rénale, cumulative et dose-dépendante caractérisée par des lésions tubulaires interstitielles et des nécroses tubulaires proximales, évolutives et irréversibles.

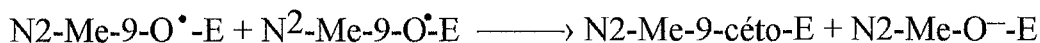
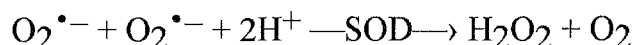
### **7.1. Elliptinium et production de radicaux libres**

En solution aqueuse, Auclair et coll (143) ont montré que l'elliptinium (N2-méthyl-9-hydroxyellipticinium) subit une autooxydation spontanée pour donner du peroxyde d'hydrogène et une quinone-imine, la N2-méthyl-9-céto-ellipticinium. L'étude de la réaction par résonance paramagnétique électronique suggère que le processus d'oxydation implique la formation initiale de l'anion superoxyde et d'une espèce radicalaire dérivée de la drogue (radical semiquinone-imine). Cette étape est alors suivie de la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, et du radical semiquinone-imine en N2-méthyl-9-oxoellipticinium.

Dans la série des ellipticines, toutes les drogues ayant un groupe hydroxyle en position 9 montre une capacité à transférer un électron à l'oxygène moléculaire pour produire le radical superoxyde.

Dugue et coll (144) ont montré "in vitro" que l'elliptinium est capable de se lier de façon covalente à l'ADN et à l'ARN et suggèrent que le radical semiquinone-imine mais surtout la forme cétonique qui possède une forte réactivité pourraient être responsables de la liaison.

**Figure 29:** Elliptinium et production de radicaux libres d'après Auclair et coll (143).



Avec: N2-Me-9-OH-E = N2-méthyl-9-hydroxyelliptinium ou elliptinium

N2-Me-9-céto-E = forme quinone-imine de l'elliptinium

N2-Me-9-O<sup>•</sup>-E = radical semiquinone-imine de l'elliptinium

## **7.2. Toxicité rénale de l'elliptinium et radicaux libres**

La production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène a été mise en cause dans la toxicité rénale de l'elliptinium, via le processus de peroxydation lipidique.

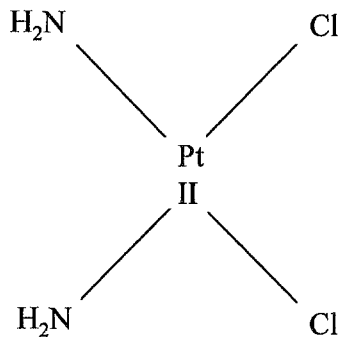
En effet, chez le rat, l'elliptinium induit une toxicité rénale dose dépendante, caractérisée par une nécrose tubulaire, des lésions tubulointerstitielles et un dépôt de lipides dans les cellules du tubule proximal. Dadoun et coll (145) ont mis en évidence, après injection d'elliptinium chez le rat une diminution des phospholipides totaux, une augmentation importante d'hydroperoxydes lipidiques et d'acides gras estérifiés au niveau du cortex rénal, par rapport aux animaux témoins. Dans les mêmes conditions, Thomas et coll (146) observent une peroxydation lipidique au niveau du cortex rénal, avec diminution de la teneur en acides gras insaturés, augmentation des acides gras libres et des aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal). La peroxydation lipidique est importante au niveau de la bordure en brosse et implique l'hydrolyse de deux phospholipides majeurs, la phosphatidyl-éthanolamine et la phosphatidylcholine, qui représentent respectivement 30 et 20% des phospholipides totaux de la bordure en brosse au niveau du cortex rénal. Ces phospholipides sont riches en acides gras insaturés et seraient donc particulièrement exposés aux dommages peroxydatifs induits par l'elliptinium.

De plus, les composés retrouvés dans les urines chez l'homme après traitement à l'elliptinium sont constitués de la drogue sous forme inchangée, et de dérivés sulfo-conjugués ce qui démontre indirectement la production d'une forme oxydée de la molécule (vraisemblablement la quinone imine N2-méthyl-9-cétoelliptinium) (5).

## 8. Le cisplatine (CIPLATYL\*)

Le cisplatine est un composé complexe du platine (II): cis-diamino dichloroplatine (CDDP).

Figure 30: Structure chimique du cisplatine.



L'ion divalent platine est lié à deux atomes de chlore et deux groupements amine en position cis. En milieu aqueux, les ions chlore sont déplacés, produisant un complexe hydraté positivement chargé et fortement nucléophile. Ce complexe va interagir avec l'ADN, l'ARN ou des protéines pour former des liaisons covalentes bi-fonctionnelles (5). Le stéréoisomère trans n'a pas d'activité cytotoxique.

Le cisplatine est employé en traitement curatif dans les cancers embryonnaires, testiculaires ou extra-gonadiques, en association et à titre palliatif dans le cancer de l'ovaire, dans les cancers épidermoïdes, toujours en association.

La toxicité aiguë est essentiellement digestive (vomissements), et rénale. La toxicité rénale porte essentiellement sur le tubule et se manifeste volontiers de manière chronique par une insuffisance rénale et/ou par une hypomagnésémie avec éventuellement tétanie. On observe plus rarement une toxicité neurologique (neuropathie périphérique) ou sensorielle (toxicité cochléaire) ; la toxicité hématologique est habituellement faible (8).

### 8.1. Toxicité rénale du cisplatine et radicaux libres

La toxicité rénale du cisplatine pourrait-être liée à des phénomènes peroxydatifs. En effet, "in vitro", le cis-platine incubé en présence d'homogénats rénaux de rat ou de liposomes de phosphatidylcholine provoque une peroxydation lipidique, la réaction

étant inhibée par apport de stobadine (un piègeur des radicaux libres) dans le milieu réactionnel (147). De même, la peroxydation lipidique induite par le cisplatine sur des coupes de cortex rénal de rat est significativement réduite par l' $\alpha$ -tocophérol (148), ou par des chélateurs du fer tels que la déféroxamine (149). Le cisplatine stimule aussi la production d'anions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène par les macrophages (150). En outre, l'administration de cisplatine chez le rat entraîne des lésions au niveau du tubule proximal, s'accompagnant d'une désorganisation cellulaire avec une augmentation de teneur en peroxydes lipidiques au niveau rénal, alors que celle-ci reste inchangée aux niveaux cardiaque et pulmonaire (151). L'administration d'hydroxyléthylrutoside, un flavonoïde pouvant piéger les radicaux libres, offre chez le rat une protection partielle contre la toxicité rénale du cisplatine. Le test utilisé est la comparaison des altérations histologiques avec celles que présentent les animaux témoins traités par le cisplatine seul (152).

Certains auteurs ont suggéré que le cisplatine pourrait agir par la production de radicaux libres oxygénés, par analogie avec la céphaloridine, un antibiotique néphrotoxique qui induit une peroxydation lipidique au niveau rénal par ce mécanisme. Cependant, la preuve directe de ce cycle d'oxydoréduction par le cisplatine n'a pas été établie (148). Toutefois, un travail très récent démontre la production de l'anion superoxyde par interaction entre de l'ADN et du cis-platine, en l'absence de cellules, et en s'aidant d'une technique de chimioluminescence (201).

En outre, la peroxydation lipidique induite par le cisplatine pourrait être liée aux altérations causées par l'agent anticancéreux au niveau des mécanismes de protection endogène contre les radicaux libres (glutathion et enzymes dépendantes du glutathion, superoxyde dismutase, catalase). Ainsi, le cisplatine, incubé avec des mitochondries de cellules corticales rénales de rat induit une diminution significative de leur teneur en protéines à groupements thiol et du glutathion réduit, en raison de la liaison directe aux groupements thiol. Il intervient aussi une diminution de la recapture du calcium par les mitochondries (153). D'ailleurs, la peroxydation lipidique provoquée par le cisplatine au niveau de coupes de cortex rénal de rat est significativement augmentée par la déplétion du glutathion réduit causée par le diéthylmaléate (154).

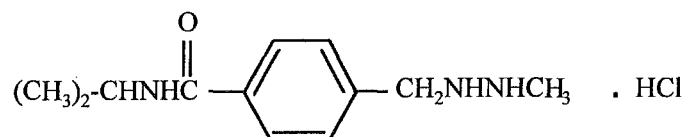
"In vivo", l'administration de cisplatine chez le rat induit dans le cortex rénal une nette diminution de l'activité de la glutathion-S-transférase, de la glutathion peroxydase et du glutathion réduit corrélée à une augmentation de la peroxydation lipidique (155), et Sadzuka et coll.(151) ont aussi montré une diminution de l'activité des superoxyde dismutases (à CuZn et à Mn) et de la catalase à ce niveau.



## 9. La procarbazine (NATULAN\*)

La procarbazine est un dérivé de la méthylhydrazine.

*figure 31*: Structure chimique de la procarbazine.



La procarbazine inhibe les synthèses de l'ADN, de l'ARN, des protéines et elle produit des cassures au niveau des chromosomes. Son métabolisme est complexe et de nombreux métabolites ont été identifiés, incluant l'azoprocarbazine qui pourrait être responsable des cassures chromosomiques, mais le lien entre le métabolisme de l'agent anticancéreux et son action biochimique reste peu clair (5).

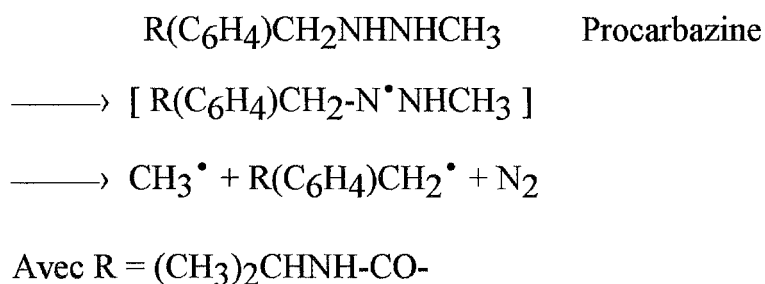
La procarbazine est utilisée dans le traitement de la maladie de Hodgkin et dans les réticulo-sarcomes lymphoïdes ou osseux.

Sa toxicité est essentiellement digestive (nausée, anorexie, vomissement) avec une atteinte hématologique faible.

### 9.1. Procarbazine et radicaux libres

Sinha et coll (156) ont mis en évidence la formation de dérivés radicalaires lors de l'activation peroxydative de la procarbazine par la peroxydase de raifort, ainsi que par la prostaglandine synthétase et par des microsomes hépatiques de rat en présence de peroxyde d'hydrogène. Ces radicaux libres sont le radical méthyl ( $\text{CH}_3^\bullet$ ) et un radical benzylique ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHNHCOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2^\bullet$ ).

**Figure 32** : Activation peroxydative de la procarbazine et production de radicaux libres. D'après Sinha et coll (156)

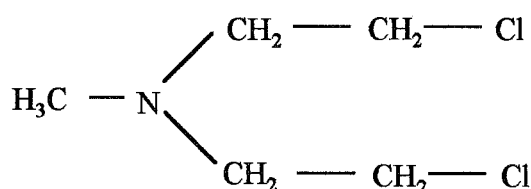


Sinha et coll. (156) ont aussi montré que le radical méthyl se lie de façon covalente à l'ADN, et suggèrent que les espèces radicalaires dérivés de la procarbazine pourraient participer à sa cytotoxicité. Cependant, l'importance de l'activation peroxydative "in vivo" de la drogue demeure encore inconnue mais serait faible. Par contre, les hydrazines pourraient donner facilement des dérivés électrophiles.

## 10. La chlorméthine (CARYOLYSINE\*)

La chlorméthine est une moutarde à l'azote et fut l'un des premiers agents anticancéreux utilisé. Elle tend à être remplacée en thérapeutique par d'autres dérivés plus stables.

**Figure 33**: Structure chimique de la chlorméthine.



La chlorméthine est un agent alkylant capable de produire en milieu aqueux un dérivé électrophile à structure imonium (199).

Son indication essentielle est la maladie de Hodgkin, et elle est utilisée en association.

Sa toxicité est essentiellement digestive, médullaire (pancytopénie d'origine centrale) et ce médicament entraîne des alopecies.

Sa toxicité est essentiellement digestive, médullaire (pancytopénie d'origine centrale) et ce médicament entraîne des alopecies.

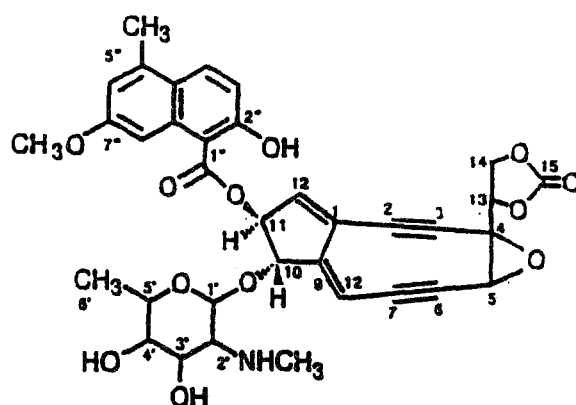
### 10.1. Chlorméthine et radicaux libres

Une étude a montré que la chlorméthine, incubée en présence de microsomes hépatiques de rat et de NADPH est susceptible de stimuler la peroxydation lipidique au niveau d'une émulsion d'acide linoléique, la réaction étant nettement diminuée en présence d'acide nordihydroguaiarétique (un antioxydant à groupement catéchol) (200). Bien que ce mécanisme n'ait pas été démontré, il est possible que l'intermédiaire à fonction imonium soit directement responsable de la formation de radicaux libres oxygénés, à moins qu'un dérivé radicalaire de cet intermédiaire soit en cause.

## 11. La néocarzinostatine

La néocarzinostatine est un antibiotique à activité antitumorale, mais non utilisée en thérapeutique, isolé de *Streptomyces Carzinostatus*. Elle est composée d'une partie protéique comportant 109 acides aminés et d'un chromophore ayant une structure d'ène-diyne époxydé (157).

**Figure 34:** Structure du chromophore de la néocarzinostatine.  
D'après Edo et coll (157)



La néocarzinostatine s'intercale de façon réversible dans l'ADN par son groupement chromophore au niveau de la partie acide naphthanoïque, avec une préférence pour les paires de base Adénine-Thymine, la partie protéique n'étant pas impliquée dans l'intercalation (158).

### 11.1. Néocarzinostatine et radicaux libres

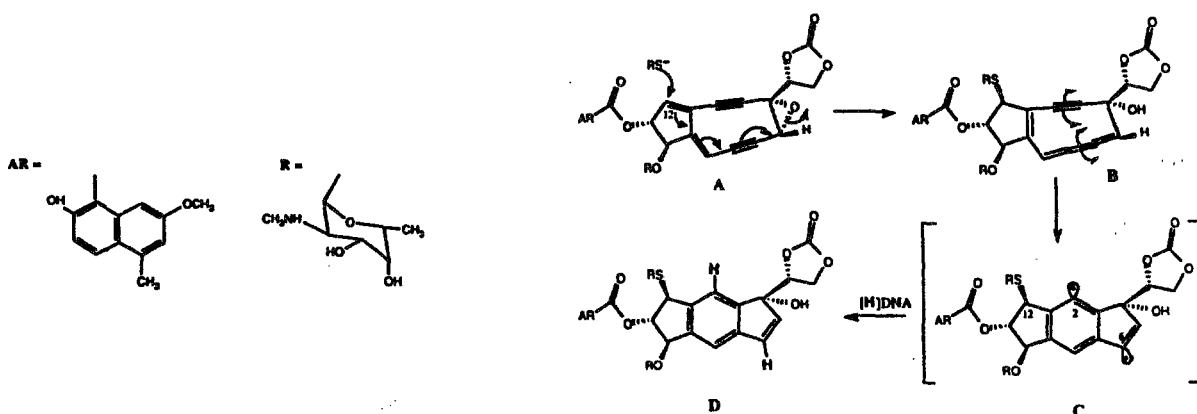
Chin et coll (159) ont montré que le chromophore peut subir, en milieu aérobie, une autooxydation avec consommation d'oxygène, formation de l'anion superoxyde, et production de cassures simple et double brin au niveau de l'ADN. Par contre, les radicaux libres oxygénés ne semblent pas impliqués dans la dégradation de l'ADN:

-l'apport de catalase, de superoxyde dismutase et de piègeurs du radical hydroxyle ne modifie pas le taux de cassures de l'ADN.

-les cassures simple et double brin de l'ADN sont considérablement augmentées par apport de thiols dans le milieu réactionnel (multipliées par 1000), alors que parallèlement la quantité d'anions superoxyde produite n'est pas modifiée.

De récentes études ont mis en évidence le rôle fondamental de l'espèce radicalaire dérivée du chromophore dans le mode d'action de la néocarzinostatine (111). Le groupement chromophore peut subir spontanément un réarrangement électronique impliquant un transfert d'électrons au niveau des triples liaisons en C2-C3 et C6-C7, avec formation à partir de la structure initiale du cycle à neuf sommets d'une structure indénique (deux cycles), possédant deux sites radicalaires (en C2 et C6). Le réarrangement électronique est considérablement augmenté lors de l'attaque nucléophile de thiols sur le C12, ce qui explique que ces composés augmentent la dégradation de l'ADN médiée par la néocarzinostatine.

**Figure 35 :** Production d'un dérivé bi-radicalaire à partir du groupement chromophore de la néocarzinostatine. D'après Dedon et coll (111).



L'attaque du bi-radical au niveau du désoxyribose aboutit à "l'arrachement" en C1', C4' et C5' d'atomes d'hydrogène avec fragmentation du sucre à l'origine des cassures simple et double brin au niveau de la chaîne d'ADN.

# CHAPITRE IV:MODIFICATIONS PROTEIQUES INDUITES PAR LES AGENTS ANTICANCEREUX

Comme on l'a vu précédemment, plusieurs catégories de médicaments anticancéreux sont capables de produire directement ou indirectement des radicaux libres. Ceux-ci pourraient à leur tour agir directement sur certaines protéines, ou encore perturber la synthèse protéique par suite des dommages qu'ils peuvent causer au niveau des acides nucléiques. Sans toujours expliquer les mécanismes mis en jeu, nous allons examiner quelques exemples de modifications, induites par des agents anticancéreux, au niveau de certaines protéines:

- l'hème oxygénase
- les protéines du choc thermique
- la glycoprotéine P
- le glutathion et les enzymes dépendantes du glutathion
- la glycophorine A
- la superoxyde dismutase

## 1.L'hème oxygénase

L'hème oxygénase est une protéine du stress, de 32 kDa. C'est une protéine microsomale dont la synthèse est induite sous l'effet de différents "stresseurs" tels que les métaux lourds (chlorure de cadmium), les rayons UV ou le peroxyde d'hydrogène. Il existe une autre forme d'hème oxygénase, au niveau mitochondrial, et codée par un gène différent mais elle n'est pas inductible. Cette enzyme catalyse la conversion de l'hème en biliverdine, qui est alors rapidement réduite en bilirubine (160). Or, il apparaît que cette dernière possède des propriétés de piègeur du radical superoxyde et des radicaux peroxy (161). De plus, il semble que l'induction de l'hème oxygénase pourrait dépendre de la production de radicaux hydroxyle. Keyse et coll. (162) ont montré que des chélateurs du fer (o-phénantroline et desferrioxamine) protègent des fibroblastes de la toxicité du peroxyde d'hydrogène et des rayonnements UV et parallèlement inhibent l'induction de l'hème oxygénase. Les auteurs suggèrent que la synthèse de l'enzyme pourrait donc constituer un mécanisme protecteur inductible afin de prévenir les dommages causés par le stress oxydatif.

Wissel et coll (163) ont effectivement montré que l'administration de doxorubicine à des souris provoque une augmentation de l'hème oxygénase au niveau des hépatocytes, ainsi qu'une diminution du taux de l'hème intracellulaire.

## 2. Les protéines du choc thermique

Les protéines du choc thermique ou "Heat Shock Proteins" (HSPs) sont nommées ainsi parce qu'elles ont d'abord été mises en évidence dans des cellules soumises à un choc thermique. Elles sont souvent dénommées en fonction de leur poids moléculaire en kiloDaltons (kDa) et semblent jouer un rôle important au niveau des fonctions cellulaires de transport des protéines dans des conditions normales et de stress. La thermotolérance, c'est à dire la capacité que possèdent des cellules préexposées à des températures non létales mais plus élevées que celles auxquelles elles sont habituellement soumises, de survivre à l'exposition ultérieure à des températures létales a été la première des fonctions attribuées aux HSPs, et, bien que faisant l'objet de controverses, des études indiquent que les HSPs, et en particulier la HSP70 (=70kDA), jouent un rôle important dans ce phénomène (164).

Les fonctions des HSPs, au niveau des cellules non stressées semblent reliées à leur rôle de "molécule chaperon". Elles permettraient l'import export d'autres protéines et la stabilisation de la conformation de celle-ci. Les HSPs représentent environ 2 à 3% des protéines au niveau des cellules vivant en condition normale, ces proportions pouvant atteindre 20% au niveau des cellules exposées à la chaleur (165).

### 2.1. Protéines du choc thermique et stress oxydatif

D'autres "stresseurs" physiologiques peuvent induire la synthèse des HSPs, et le stress oxydatif apparaît comme un élément important dans l'induction de la synthèse de ces protéines.

Chez la gerbille, lors du cycle ischémie/reperfusion, Nowak (166) met en évidence une augmentation du taux des HSPs70, la synthèse de ces HSPs étant maximale huit heures après la reperfusion. De même, chez le rat, l'ischémie cérébrale induit la synthèse de la HSP27 et de la HSP70, alors que se développe parallèlement une tolérance à l'ischémie (167). Or pendant le cycle ischémie/reperfusion, des radicaux libres oxygénés sont produits durant le métabolisme de la xanthine et de l'hypoxanthine par la xanthine oxydase, et la synthèse d'HSPs pourrait être induite sous l'action de ces radicaux libres (165). D'ailleurs, la possibilité que les chocs thermiques provoquent la synthèse des HSPs via la production de radicaux libres causant une peroxydation lipidique, a été envisagée par certains auteurs (168,169). Ainsi, le choc thermique induit chez des cellules Hela une peroxydation lipidique, et l'utilisation de piègeurs des radicaux libres inhibe non seulement celle-ci mais aussi la synthèse d'HSPs provoquée également par le choc thermique (168). En outre, l'exposition de fibroblastes de hamster chinois à la chaleur ou au peroxyde d'hydrogène conduit à la synthèse d'une HSP70, corrélée avec une augmentation de la tolérance à une exposition ultérieure au peroxyde d'hydrogène (169).

Le mécanisme potentiel de la protection contre les radicaux libres par les HSPs pourrait être la prévention de la dégradation des protéines (rôle de chaperon des HSPs). Il a d'ailleurs été suggéré que des protéines modifiées, sous l'effet de la chaleur ou d'une attaque oxydative pourrait représenter au niveau de la cellule le signal activant la transcription des gènes codants pour les HSPs (170).

## **2.2. Protéines du choc thermique et agents anticancéreux**

Des études ont montré une corrélation positive entre la synthèse des HSPs et la résistance à certains agents anticancéreux susceptibles d'entraîner un stress oxydatif.

Ciocca et coll. (171) ont étudié l'effet de l'exposition à la chaleur de cellules tumorales mammaires sur la cytotoxicité de différents agents anticancéreux (doxorubicine, colchicine, 5-fluorouracile, cis-platine, méthotrexate). Cette étude révèle que le traitement par la chaleur entraîne une augmentation des teneurs en HSP70 et en HSP27 aux niveaux des cellules tumorales, corrélée à une résistance à la doxorubicine mais pas aux autres agents anticancéreux testés. De plus, Huot et coll (172) ont montré une corrélation positive entre la synthèse de la HSP27 par des cellules de hamster chinois transfectées à l'aide d'un plasmide contenant le gène structural de la HSP27 humaine et la survie cellulaire à l'exposition de doxorubicine et de daunorubicine. De même, Osterreich et coll (173) ont observé sur des cellules tumorales mammaires transfectées avec le gène codant pour la HSP27 humaine, une surexpression de cette protéine s'accompagnant d'une résistance multipliée par trois à la doxorubicine. Enfin, une diminution de sensibilité à la cytotoxicité de l'actinomycine D a été rapportée après des essais réalisés sur des cellules de hamster chinois ayant subi un traitement à la chaleur (174).

Il semble aussi que la doxorubicine, le cisplatine et la bléomycine puissent être des inducteurs de la synthèse des HSPs et le rôle d'une telle induction via le stress oxydatif induit par ces agents anticancéreux a été évoqué (165,175).

Ainsi le traitement de cardiocytes de souris par la doxorubicine entraîne la synthèse de l'HSP 60 et de l'HSP 70 (175). L'exposition de cellules tumorales d'Ehrlich au cisplatine cause une augmentation significative de trois isoformes de la HSP25 et bien que cet anticancéreux n'entraîne pas la réponse générale au stress observée après traitement par la chaleur, il cause une augmentation de la thermotolérance des cellules tumorales d'Ehrlich (176). Enfin, Moseley et coll (177) ont étudié l'effet de la bléomycine sur des fibroblastes pulmonaires transfectés avec un gène contenant celui de la HSP70. La bléomycine utilisée à des doses induisant une augmentation de la prolifération des fibroblastes pulmonaires provoque l'induction du gène promoteur de la HSP70.

### 3. La glycoprotéine P

La glycoprotéine P est le support moléculaire de la résistance pléiotropique ou "multidrogues" (=MDR), que l'on observe au niveau de cellules en culture maintenues en présence de concentrations progressivement croissantes de différents agents anticancéreux (178).

Il avait été observé chez les cellules présentant ce phénotype MDR une diminution de la teneur intracellulaire en médicament, liée à l'augmentation de son efflux, avec consommation d'ATP que l'on pouvait bloquer par des agents découplant la phosphorylation oxydative. La comparaison des membranes plasmiques de cellules sensibles et résistantes permet de découvrir dans ces dernières une glycoprotéine dont la concentration augmentait avec le niveau de résistance (179).

L'observation d'une zone se colorant de façon homogène sur un chromosome dans la plupart des lignées cellulaires présentant le phénotype MDR et suggérant l'intervention d'une amplification génique dans le processus d'acquisition de la résistance pléiotropique a conduit Roninson et coll (180) à rechercher des séquences d'ADN amplifié dans des cellules de Hamster chinois MDR, grâce à une technique de renaturation sur gel. Un gène amplifié de 80 kilobases fut ainsi identifié et appelé gène *mdr*. Celui-ci est composé de deux séquences *mdr1* et *mdr2* et seule la première est capable d'hybrider un ARN messager de 4,5 kilobases dans les cellules de diverse origine, la séquence *mdr2* n'étant pas transcrite bien que parfois amplifiée. Ces deux gènes sont situés sur le chromosome 7 chez l'homme (178).

Le séquençage de l'ADN du gène *mdr1* humain a permis de connaître la structure primaire de son produit, la glycoprotéine P. Celle-ci est constituée de 1280 aminoacides, elle traverse douze fois la membrane cellulaire, créant une conformation ondulée caractéristique d'une protéine responsable d'un système de transport ATP-dépendant. Sur la face interne de la membrane s'étendent deux importantes régions de la protéine avec des domaines ATPasiques et c'est vraisemblablement au niveau même de la membrane plasmique que la glycoprotéine P est capable de prendre en charge les xénobiotiques qu'elle contribuerait à transporter hors de la cellule.(179,181). En réalisant une photoactivation indirecte par le biais de l'irradiation de la doxorubicine ou de la rhodamine 123, il est possible de montrer que les molécules sont au contact de la glycoprotéine P et qu'elles sont directement extraites de la membrane plasmique sans entrer dans la cellule (181).

Les agents anticancéreux capables d'induire la surexpression de la glycoprotéine P quand ils sont maintenus à des concentrations croissantes, en présence de différentes lignées cellulaires sont (178, 179, 182):

- les anthracyclines: doxorubicine, daunorubicine,
- la colchicine,
- l'actinomycine D,



-les vinca-alcaloïdes: vincristine, vindésine, vinblastine.

Les lignées cellulaires acquièrent alors le phénotype de résistance pléiotropique et présentent une résistance croisée avec les différents agents anticancéreux précédents, ainsi qu'avec la mitoxantrone, les épipodophyllotoxine (étoposide, ténoposide). Cependant, la résistance aux agents additionnels varie d'une lignée à l'autre et bien que les lignées "multidrogues résistantes" sélectionnées avec des anticancéreux de structure et de mécanisme d'action différents hyperexpriment le même gène *mdr1*, elles manifestent généralement une résistance préférentielle vis à vis de l'agent anticancéreux utilisé pour la sélection de la lignée (178,179). Ainsi, une lignée de carcinome KB sélectionnée par la vinblastine devient résistante à celle-ci (213 fois) et à la colchicine (171 fois). Une lignée de même origine, sélectionnée par la colchicine présente une résistance à cette dernière (263 fois) et à la vinblastine (96 fois). Ceci suggère que suivant l'agent anticancéreux inducteur utilisé, les cellules exposées pourraient présenter des différences dans l'expression génétique et physiologique du phénotype MDR.

Enfin, malgré de nombreuses études qui ont fourni des arguments convergents, la preuve indiscutable que la glycoprotéine P est un transporteur actif de médicaments vers l'extérieur des cellules n'a pas encore été apportée et son mécanisme d'action n'est pas expliqué, en particulier parce qu'aucun site de liaison médicament/protéine n'a pu être identifié (179).

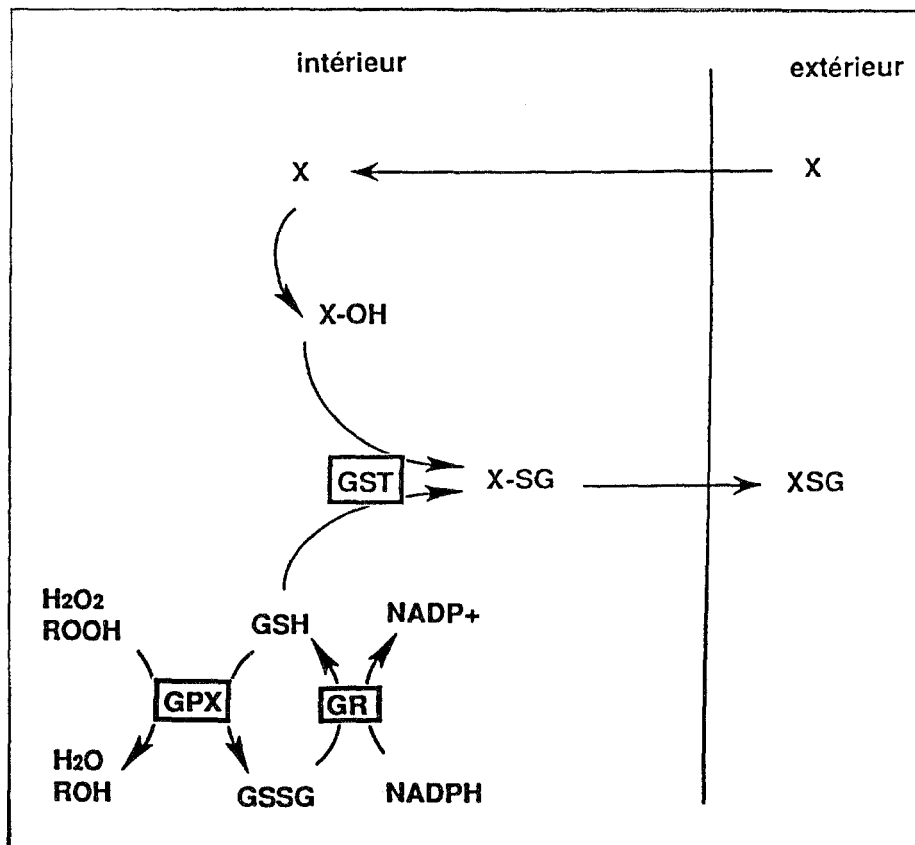
## **4. Glutathion et enzymes dépendantes du glutathion**

Le glutathion, tripeptide porteur d'une fonction thiol joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire comme cofacteur de certaines enzymes, et en particulier dans le métabolisme, le transport de substances étrangères à l'organisme, ou xénobiotiques, et dans la détoxification des radicaux libres.

La glutathion peroxydase séléno-dépendante est une enzyme capable de prendre en charge le peroxyde d'hydrogène ainsi que d'autres peroxydes pour les détoxifier, en oxydant le glutathion.

De même, les glutathion-S-transférases sont souvent associées au glucoronyl et sulfo transférases comme enzymes de phase II dans le métabolisme des médicaments. Outre son activité de conjugaison, la glutathion-S-transférase  $\pi$  possède une activité glutathion-peroxydasique lui permettant de détoxifier les peroxydes lipidiques et les hydroperoxydes mais pas le peroxyde d'hydrogène (183).

**Figure 36:** Schéma simplifié du métabolisme du glutathion et de son rôle dans la détoxification des substances xénobiotiques. D'après Robert J.(179).



X: xénobiotique ; GSH: glutathion réduit ; GSSG: glutathion oxydé ; GST: glutathion-S-transférase ; GPX: glutathion peroxydase ; GR: Glutathion réductase.

L'augmentation des teneurs en glutathion et celle des enzymes dépendantes du glutathion après exposition à divers agents anticancéreux a été étudiée au niveau de nombreuses lignées cellulaires.

#### **4.1. Glutathion et enzymes dépendantes du glutathion et les agents alkylants**

Le glutathion et les enzymes dépendantes du glutathion ont été assez tôt mis en cause dans le mécanisme de résistance aux agents alkylants. Ainsi, des lignées de cellules ovariennes, rendues résistantes par exposition répétée au melphalan (moutarde à

l'azote), et au cis-platine présentent une résistance croisée entre les deux agents anticancéreux ainsi qu'une radiorésistance. La comparaison des teneurs en glutathion réduit intracellulaire montre une augmentation de celles-ci, qui sont multipliées par deux ou trois dans les lignées résistantes par rapport à la lignée parentale. De plus, la déplétion en glutathion réduit au moyen de buthionine sulfoximine (BSO) appliquée sur des cellules résistantes est suivie d'une perte de la résistance au cisplatine et au melphalan ainsi qu'aux radiations ionisantes (184). Une lignée de cellules de carcinome pulmonaire rendues résistantes au cisplatine par exposition répétée à l'agent anticancéreux, montre une augmentation significative de sa teneur en glutathion réduit ainsi que de l'activité de la glutathion transférase  $\alpha$  par rapport à la lignée parentale sensible. Le prétraitement par la BSO augmente la cytotoxicité du cisplatine au niveau des cellules résistantes, mais aussi au niveau des cellules sensibles. L'augmentation de la teneur en glutathion réduit entraînerait un accroissement de l'élimination cytosolique du cisplatine et aurait aussi un effet au niveau nucléaire sur la réparation des adduits du cisplatine avec l'ADN (185). De plus, elle permettrait aux cellules résistantes une meilleure tolérance au stress oxydatif induit par le cisplatine. Ainsi, une lignée cellulaires de fibroblastes de hamster chinois résistante au peroxyde d'hydrogène et possédant une teneur en glutathion réduit augmentée par rapport à la lignée parentale sensible présente une résistance croisée avec le cisplatine. Le traitement à la BSO entraîne alors une disparition de la résistance au cisplatine ainsi qu'au peroxyde d'hydrogène (186).

L'exposition répétée de cellules issues de myélome humain à des doses croissantes de melphalan entraîne une résistance de celle-ci à l'agent anticancéreux, et les cellules résistantes possèdent une teneur en glutathion-S-transférase  $\pi$ , ainsi qu'en glutathion réduit significativement augmentée par rapport aux cellules sensibles (187). De même des cellules de hamster chinois rendues résistantes au chlorambucil (CHO ChIR) par exposition répétée à cet agent anticancéreux possèdent une teneur en glutathion réduit et en glutathion S transférase augmentée par rapport à celle de la lignée sensible. Il existe une corrélation positive entre la résistance de cette lignée et la concentration de chlorambucil requise pour induire approximativement la même proportion de ponts interbrins à l'ADN qu'au niveau des cellules sensibles traitées par ce même produit. Par contre, l'accumulation du chlorambucil est identique au niveau des deux lignées, ce qui suggère donc que l'augmentation de la détoxification par le système glutathion/glutathion-S-transférase est un mécanisme important dans la résistance des cellules CHO ChIR (188). Des cellules d'ovaire de hamster chinois, exposées à des concentrations croissantes de chlorambucil acquièrent aussi une résistance à l'agent anticancéreux, ainsi qu'à d'autres moutardes à l'azote (melphalan, mechloréthamine), les cellules résistantes se caractérisant par une hyperexpression de la glutathion-S-transférase  $\alpha$  ainsi que par une augmentation des teneurs en glutathion. Une analyse à l'aide de la

technique Southern Blot indique que les gènes codant pour la glutathion-S-transférase  $\alpha$  sont amplifiés de quatre à huit fois au niveau des cellules résistantes (189).

D'une façon générale, les moutardes à l'azote et le cisplatine sont des substrats directs des glutathion-S-transférases qui assurent leur détoxification par leur conjugaison avec le glutathion, ce qui pourrait conférer une résistance cellulaire vis à vis de ces agents. Différents mécanismes peuvent donc concourir à une augmentation de la détoxification, bien que les bases moléculaires de leur mise en jeu fassent encore défaut: augmentation de la disponibilité en glutathion ou hyperexpression de la glutathion S transférase. De plus, les mécanismes de résistance aux alkylants ne s'expliquent certainement pas tous par l'intervention du glutathion. Ainsi, plusieurs lignées cellulaires issues de mélanome malin humain et exposées chacune à un agent alkylant (cisplatine, 4-hydroxyperoxycyclophosphamide, melphalan) développent une résistance à l'anticancéreux auquel elles ont été exposées et présentent une augmentation de l'activité de la glutathion-S-transférase  $\pi$ . Par contre, aucune résistance croisée n'est observée entre les différents agents alkylants au niveau de chaque lignée résistante (190).

Enfin, une autre isoenzyme de la glutathion S transférase (isoenzyme  $\mu$ ) est produite en quantité accrue par des cellules isolées de tumeurs cérébrales chez le rat et exposées à la 1-3bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée (BCNU). La glutathion-S-transférase  $\mu$  permettrait la dénitrosation des nitrosourée en composés inactifs et pourrait être impliquée dans la résistance à ces agents anticancéreux (191).

#### **4.2. Glutathion et enzymes dépendantes du glutathion et les anthracyclines**

Les teneurs en glutathion et en enzymes dépendantes du glutathion sont aussi modifiées lors du traitement de cellules tumorales par les anthracyclines. Ainsi, après exposition à des doses croissantes de doxorubicine, des cellules de cancer du sein humain acquièrent une résistance vis à vis de l'anthracycline ; les concentrations en glutathion, glutathion S-transférase  $\pi$ , glutathion peroxydase séléno-dépendante sont alors augmentés par rapport à celles qui caractérisent la lignée sensible (192). De même, des cellules leucémiques de souris P388, soumises à des concentrations croissantes de doxorubicine deviennent résistantes à celle-ci, et contiennent des teneurs augmentées en glutathion transférase  $\pi$  et glutathion peroxydase séléno-dépendante (193). Les mêmes résultats ont été obtenus par Lee et coll (194) sur des cellules d'adénocarcinome mammaire de souris rendues résistantes à la doxorubicine. Les auteurs observent une résistance croisée avec le melphalan, mais pas avec la vincristine, la vinblastine ou l'étoposide (absence du phénotype MDR). D'ailleurs, la présence de la glycoprotéine P n'a pu être

détectée par réaction avec des anticorps monoclonaux anti-glycoprotéine P au niveau des cellules résistantes ou sensibles. Enfin, Sinha et coll (195) ont mené des études sur une lignée de cellules tumorales de cancer du sein, et sur la lignée correspondante rendue résistante à la doxorubicine par exposition à celle-ci. La sous-lignée résistante montre une surexpression de la glycoprotéine P et une nette diminution de l'accumulation intracellulaire de l'anticancéreux, ainsi qu'une augmentation intracellulaire de la glutathion-S-transférase  $\pi$  et de la glutathion peroxydase sélénodépendante. Les auteurs observent au moyen de la RPE, la production du radical hydroxyle au niveau des cellules sensibles mais pas au niveau des cellules résistantes. La même différence est observée par l'utilisation de cellules lysées ce qui indique que la différence de la concentration intracellulaire en doxorubicine n'explique pas exclusivement ce résultat.

Il est vraisemblable que dans de nombreuses lignées cellulaires, le mécanisme de résistance dépendant de la glycoprotéine P soit complété par un mécanisme de tolérance acquise lié aux capacités de détoxication des radicaux libres oxygénés.

Dans ces conditions, la glutathion S transférase  $\pi$  interviendrait en exerçant son activité glutathion peroxydasique envers les hydroperoxydes et cette action serait complétée par l'activité de la glutathion peroxydase sélénodépendante envers les hydroperoxydes et le peroxyde d'hydrogène et peut-être par celle du glutathion envers les radicaux libres oxygénés. L'induction de la synthèse de ces différents systèmes détoxifiants est vraisemblablement liée au stress oxydatif occasionné par la doxorubicine.

## 5. Glycophorine A

La glycophorine A (GPA) est une sialoglycoprotéine de la surface membranaire des érythrocytes dont une forme allélique (M) disparaît lorsque le locus correspondant, situé dans la région q28-31 du chromosome 4, a subi une mutation, sous l'effet de traitements réalisés au moyen de différents agents, soit physiques, tels que les rayonnements ionisants, ou chimiques, tels que les médicaments anticancéreux. La fréquence moyenne ( $V_f$ ) d'apparition de ces variants défectifs, NO et NN, est déterminée à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à des substances fluorescentes, permettant l'utilisation de la cytométrie de flux pour leur évaluation quantitative.

$V_f$  ne dépasse pas 12 par  $10^6$  cellules chez les patients cancéreux non traités, mais s'accroît progressivement au cours du traitement, et reste élevée pendant une durée pouvant atteindre six mois après celui-ci, en particulier dans les cas où les associations VMF (vinblastine, méthotrexate, 5-fluorouracile), CAF (cyclophosphamide, adriamycine, 5-fluorouracile) et CMF (cyclophosphamide, méthotrexate, 5-fluorouracile) sont utilisées (196). Ce travail précise que le traitement des cancers du sein associant la cyclophosphamide et l'adriamycine entraîne une élévation constante du nombre de cellules variantes pour la GPA, alors que la cyclophosphamide utilisée

seule cause des augmentations moindres et plus variables de celui-ci. Les différences d'activité entre: d'une part l'adriamycine, causant des effets plus prononcés, et, d'autre part, la cyclophosphamide, sont attribuées à l'effet intercalant direct de la première, tandis que la seconde nécessite une activation préalable par une oxydase à cytochrome-P450 pour former la moutarde alkylante qui serait la forme active. Bien que l'augmentation de proportion des cellules variantes soit considérée comme transitoire, en raison du recyclage rapide de la lignée érythrocytaire, le lien entre ce type de mutations somatiques et le risque de cancer ultérieur est considérée comme probable.

Dans le cas des irradiations comme celle d'Hiroshima, il semble que les mutations de la GPA aient persisté des dizaines d'années après l'évènement causal.

D'autres marqueurs que les mutants de GRA ont également été testés au cours des traitements anticancéreux et après ceux-ci. En effet, selon Perera et coll. (197), il existe des corrélations entre les mutations des locus GPA et HPRT ( hypoxanthine phosphoribosyl transférase), ainsi qu'entre les mutations de GPA et la fréquence des micronoyaux. Dans cette étude, les traitements par le cis-platine, l'étoposide et la bléomycine ont également été prises en compte. Dans le cas du cis-platine, les liaisons aux protéines plasmatiques ainsi que les adduits sur l'ADN ont été également évalués, elles sont corrélées entre elles, et la liaison Pt-protéines est significativement corrélée à l'échange de chromatides-soeurs (sister-chromatid exchange).

Plus récemment, Grant et coll (198) ont montré que le test de GPA donnait des valeurs accrues plus de six mois après des traitements anticancéreux réalisés aussi bien au moyen de radiothérapies localisées, ou à l'aide d'implants, ou bien de cis-platine, ou encore, de façon moins certaine, lorsque d'autres agents de chimiothérapie sont employés. Ainsi, le test des variants de la glycophorine A est proposé comme moyen d'adapter les traitements, afin de réduire le risque de tumeurs secondaires. Dans le cas du cis-platine, le test de la GPA donne encore des valeurs accrues jusqu'à sept ans après le traitement, alors que l'association cyclophosphamide-doxorubicine ne causerait pas d'effets au delà de la durée de vie des globules rouges. Dans ce dernier cas, l'utilisation concurrente d'autres marqueurs de la cancérogenèse devrait permettre une appréciation plus fiable du degré de dommage génétique à long terme.

## 6. Superoxyde dismutase

D'après une discussion très récente concernant les effets du cis-platine, celui-ci provoque, sur deux lignées de cellules cancéreuses un accroissement d'activité superoxyde-dismutase (SOD), probablement due à la production accrue d'anion superoxyde(201). Une telle augmentation induite d'activité de la SOD n'est certainement pas un phénomène isolé, et pourrait se produire dans le cas d'autres médicaments anticancéreux.



## CONCLUSION

Ce travail de synthèse documentaire et de rédaction d'une mise au point concerne surtout les mécanismes radicalaires qui semblent impliqués à la fois dans le mode d'action de certains médicaments anticancéreux et dans le déclenchement de leurs effets indésirables. Il comporte deux parties, consacrées, pour la première à des généralités relatives à la chimiothérapie anticancéreuse ainsi qu'aux radicaux libres, et pour la seconde à la production de ces radicaux sous l'effet de ce type de traitement, ainsi qu'aux conséquences biochimiques qui en découlent, en particulier dans le domaine des protéines.

Dans le premier chapitre, nous présentons des connaissances essentielles concernant la chimiothérapie anticancéreuse, et portant en particulier sur les modes d'action des médicaments mis en oeuvre, ainsi que sur leur toxicité, dont la localisation très diverse, médullaire, cardiaque, hépatique, etc..., évoquerait, en première analyse, des mécanismes spécifiques pour chaque groupe de substances touchant un organe particulier.

Le second chapitre concerne surtout les radicaux libres dérivés de l'oxygène, y compris l'oxyde nitrique, dont l'implication dans de très nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques fait l'objet d'un nombre croissant de recherches. Les causes normales et pathologiques de production de ces radicaux sont présentées, ainsi que leurs effets dommageables sur les principaux composants biochimiques de l'organisme : lipides, particulièrement sensibles, protéines, acides nucléiques. Les principaux moyens naturels de protection antiradicalaire, enzymatiques ou non, sont alors décrits.

La seconde partie a pour objet l'étude des effets des médicaments anticancéreux médiés par la production de radicaux libres. La production de ces radicaux déclenchée par les principaux médicaments anticancéreux, fait l'objet du troisième chapitre. Les mécanismes chimiques mis en jeu dans ce phénomène sont présentés, ainsi que les conséquences qui en découlent, tant bénéfiques, en matière de cytotoxicité vis-à-vis de cellules tumorales, que néfastes, s'agissant d'effets indésirables. Nous examinons successivement de ces points de vue les anthracyclines, la mitomycine C, la mitoxantrone, l'actinomycine D, la bléomycine, l'étoposide, l'elliptinium, le cis-platine, la procarbazine, la chlorméthine et enfin la néocarzinostatine, non utilisé en thérapeutique. Devant un aussi vaste éventail de preuves directes ou indirectes de la mise en jeu de radicaux associée à l'utilisation, "in vitro" et "in vivo" de ces médicaments, on peut raisonnablement avancer qu'il s'agit d'un mécanisme d'action important de ceux-ci. Du reste, au moins dans le cas de la doxorubicine, l'efficacité

chez l'animal et chez l'homme de l'ICRF187, un chélateur du fer, contre la cardiotoxicité de l'anticancéreux offre une perspective encourageante dans l'utilisation de molécules inhibant la production de radicaux libres oxygénés dépendante du fer et donc la toxicité en découlant.

Enfin, dans le quatrième et dernier chapitre, nous présentons en détail les modifications protéiques induites par les agents anticancéreux, ou les radicaux qui en dérivent. Ce sujet, qui n'a fait l'objet d'aucune autre revue récente, pourrait peut-être déboucher sur une meilleure compréhension de l'importance des défenses antiradicalaires des cellules tumorales, comparée à celle des cellules normales et de la mise au point de traitements visant à réduire les phénomènes de résistance, et ainsi à favoriser l'effet thérapeutique précieux des médicaments anticancéreux susceptibles d'occasionner un stress oxydatif.



*Bibliographie*

- 1-Marty M., Calvo F., Espie M., Lagner J.M., Florentin I., Giroud J.P. (1988) Médicaments anticancéreux. In: Giroud J.P., Mathe G., Meyniel G. Pharmacologie clinique: bases thérapeutiques. Expansion Scientifique Française. 2° édition p.1894-1945.
- 2-Chauvergne J., Hoerni B. (1992) Chimiothérapie anticancéreuse. 2° édition, Masson.
- 3-Calop J., Carraz G. Anticancéreux et cancérogènes.(1988) In: Calop J., Carraz G. Pharmacodynamie spéciale. Tome 4. Edition Ellipses 181-229.
- 4-Jacquemin-Sablon A. (1993). Mécanismes d'action des substances anti-tumorales. In: Landry Y., Gies J.P. Pharmacologie moléculaire. Mécanismes d'action des médiateurs et des médicaments. 2ème édition Arnette. 603-636.
- 5-Armand J.P., Cano J.P., Fabre G., Gouyette A., Rhaman R., Riva C., Robert J. (1986) Chimiothérapie. In: Tubiana M. Thérapeutique des cancers. Edition Flammarion. 193-287.
- 6-Le Jeune C., Paule B. (1993) Chimiothérapie anticancéreuse. In: Impact internat. Thérapeutique. N°20, 381-387.
- 7-Clavel M. (1991). Chimiothérapies anticancéreuses. Classification et mode d'action. Rev.Prat. 41, 2759-2766.
- 8-Powis G., Hacker M.P. (1991). The toxicity of anticancer drugs. Pergamon Press.
- 9-Samoun M., Potocka A.C., Pillière R, Delorme G., Prinseau J., Baglin A. (1991) Cardiotoxicité du 5-fluorouracile. Presse médicale. 20, 458-460.
- 10-Fraisser L.H., Kanekal S., Kehrer P. (1991) Cyclophosphamide toxicity, characterising and avoiding the problem. Drugs. 42, 781-795.
- 11-Emerit J., Fechner J., Galli A., Clavel J.P., Congy F. (1986) Les radicaux libres dérivés de l'oxygène et la peroxydation lipidique. Rôle en biologie cellulaire et en physiopathologie. Presse Medicale 15, 751-754.
- 12- Reilly P.M., Schiller H.J., Bulkley G.B. (1990) Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am. J; Surg. 161. 488-503.
- 13-Emerit J., Michelson A.M.(1982) Les radicaux libres en médecine et en biologie. Sem.Hop. 58, 2670-2675.
- 14-Clavel J.P., Emerit J., Thuillier A. (1985) Lipoperoxydation et radicaux libres. Rôle en biologie cellulaire et pathologie. Path. Biol. 33, 61-69.
- 15-Freedman B.A., Crapo J.D. (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab. Invest. 47, 412-426.
- 16-Chouvet J. (1989) Place des radicaux libres dans la physiopathologie des arthropathies des hémodialysés. Thèse Pharmacie. Université J. Fourier Grenoble.
- 17-Anggard E. (1994) Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. Lancet 343, 1199-1206.
- 18-Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.C. (1994) Principes de biochimie. 2nde édition Flammarion.
- 19-Brawn K., Fridovich I. (1980) Superoxide radical and superoxide dismutase threat and defense. Acta Physiol.Scand. 492, 9-18.

- 20-Cohen G.M., D'Arcy Doherty M. (1987) Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals. *Br. J. Cancer* 55, 46-52.
- 21-Vaca C.E., Wilhelm J., Harm-Ringdahl M. (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mut. Res.* 195, 137-149.
- 22- Slater F.T. (1984) Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 1-15.
- 23-Favier A. (1990) Intérêt des marqueurs de la peroxydation lipidique. *Compte rendus des XIII emes journées nationales de biologie.* Lyon. 45-53.
- 24-Wolff S.P., Gainer A., Dean D.T. (1986) Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS*, 11 29-31.
- 25-Imlay J.A., Linn S. (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302-1309.
- 26-Ward J.F., Evans J.W., Limoli C.L., Calabro-Jone P.M. (1987) Radiation and hydrogen peroxide-induced free radical damage to DNA. *Br. J. Cancer* 55, 105-112.
- 27-Mouret J.F. (1987) Formation d'adénine-N-oxyde sur l'ADN par action de l'eau oxygénée ou de l'acide métachloroperbenzoïque. Thèse Pharmacie. Université J. Fourier Grenoble.
- 28-Jadot G. (1988) Les superoxydes dismutases: biochimie, pharmacologie, thérapeutique. Edition Masson.
- 29-Sato S., Iwaizumi M., Handa K., Tamura Y. (1977) Electron spin resonance study on the mode of generation of free radicals of daunomycin, adriamycin, and carboquone in NAD(P)H microsome systeme. *Gann*, 68, 603-608.
- 30-Butler J., Hoey B.M. (1987) Are reduced quinones necessarily involved in the antitumor activity of quinone drugs. *Br. J. Cancer*, 55, 53-59.
- 31-Butler J., Hoey B.M., Swallow A.J. (1985) Reaction of the semiquinone free radicals of antitumor agents with oxygen and iron complexes *Febs Lett* 182 95-98.
- 32-Komiyama T., Kikuchi T., Suguora Y. (1982) Generation of hydroxyl radical by the anticancer quinone drugs, carbazilquinone, mitomycin C, aclacinomycin A and adriamycin, in the presence of NADPH-cytochrome P 450 reductase. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3551-3656.
- 33-Pietronigro D.D., Mc Guinness J.E., Koren M.J., Crippa R., Seligman M.L., Demopoulos H.B. (1979) Spontaneous generation of adriamycin semi-quinone at physiologic pH. *Physiol.Chem.Phys.* 11, 405-413.
- 34-Thornalley P.J., Bannister W.H., Bannister J.V. (1986) Reduction of oxygen by NADH/NADH dehydrogenase in the presence of adriamycin. *Free. Res. Commun.* 2, 163-171.
- 35-Mimnaugh E.G., Theodore E.G., Trush M.A.(1983) Stimulation of mouse heart and liver microsomal lipid peroxidation by anthracycline anticancer drugs. Characterization and effects of reactive oxygen scavengers. *J. Pharm. Exp. Ther.*226, 806-816.
- 36-Winterbourn C. (1981) Evidence for the production of hydroxyl radicals from the adriamycin semiquinone and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Febs lett.* 136, 89-94.
- 37-Bates D.A., Winterbourn.C.C. (1982) Deoxyribose breakdown by the adriamycin semiquinone and H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> . Evidence for hydroxyl radical participation. *Febs. Lett.* 145, 137-142.

- 38-Beraldo H., Garnier-Suillerot A., Tosi L., Lavelle F. (1985) Iron III-adriamycin and iron III-daunorubicin complexes physicochemical characteristics, interaction with DNA, and antitumor activity. *Biochemistry*, 24, 284-289.
- 39-Thomas C.E., Aust S.D.(1986) Release of iron from ferritin by cardiotoxic anthracycline antibiotics. *Arch. Biochem. biophys.* 248, 684-689.
- 40-Gianni L., Zweier J.L., Levy A., Myers C.E. (1985) Characterisation of the cycle of iron-mediated electron transfer from adriamycin to molecular oxygen. *J.Biol.Chem.* 260, 6820-6826.
- 41-Gutteridge J.M. (1984) Lipid peroxidation and possible hydroxyl radical formation stimulated by the self-reduction of a doxorubicin iron(III) complex. *Biochem.Pharmacol.* 33, 1725-1728.
- 42-Muindi J.R., Sinha B.K., Gianni L., Myers C.E.(1984) Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complexes. *Febs Lett* 172, 226-230.
- 43-Wallace K.B.(1984) Non-enzymatic oxygen activation and stimulation of lipid peroxidation by doxorubicin-copper. *Tox. Appl. Pharmacol.* 86, 69-79.
- 44-Sinha B.K., Trush M.A., Kennedy K.A., Mimnaugh E.G. (1984) Enzymatic activation and binding of Adriamycin to nuclear DNA. *Cancer Res.* 27, 24.
- 45-Scheulen M.E., Kappus H., Nienhaus A., Schmidt G.C. (1982) Covalent protein binding of reactive adriamycin metabolites in rat liver and rat heart microsomes. *J.Cancer Res.Clin.* 103, 39-48.
- 46-Ghezzi M.G., Donelli M.G., Pantarotto C., Facchinetti R., Garattini S. (1981) Evidence for covalent binding of Adriamycin to rat liver microsomal protein. *Biochem. Pharmacol.* 30, 175-7.
- 47-Sinha B.K. (1989) Free radicals in anticancer drug pharmacology. *Chem. Biol. Interaction* 69, 293-317.
- 48-Doroshov J.H. (1986) Prevention of doxorubicin-induced killing of MCF 7 human breast cancer cells by oxygen radical scavengers and iron chelating agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 330-335.
- 49-Doroshov J.H. (1986) Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 4514-4518.
- 50-Sinha B.K., Katki A.G., Batist B., Cowan K.H., Myers C.E. (1987) Adriamycin stimulated hydroxyl radical formation in human breast tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 36, 793-796.
- 51-Bozzi A., Mavelli I., Mondovi B., Strom R., Rotilio G. (1981) Differential cytotoxicity of daunomycin in tumor cells is related to glutathione-dependent hydrogen peroxide metabolism. *Biochem. J.* 194, 369-372.
- 52-Russo A., Mitchell J.B. (1985) Potentiation and protection of doxorubicin cytotoxicity by cellular glutathione modulation. *Cancer Treat. Rep.* 69, 1293-1296.
- 53-Berlin V., Haseltine W.A. (1981) Reduction of adriamycin to a semi-quinone free radical by NADPH-cytochrome P450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *J. Biol. Chem.* 10, 4747-4756.
- 54-Haidle C.W, Mc Kinney S.H. (1986) Adriamycin-mediated introduction of a limited number of single strand breaks into supercoiled DNA. *Cancer Biochem. Biophys.* 8, 327-335.
- 55-Akman J.W., Doroshov J.H., Burbe T.G., Dizdaroglu M. (1992) DNA modifications induced in isolated human chromatin by NADH dehydrogenase catalysed reduction of doxorubicin. *Biochemistry* 31, 3500-3006.

- 56-Svingen B.A., Powis G. (1981) Pulse radiolysis studies on antitumor quinones: radical lifetimes, reactive with oxygen and one-electron reduction potentials. *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 119-121.
- 57-Kalyaranaman T., Perez-Reyes E., Mason R.P. (1980) Spin-trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs. *Biochem. Biophys. Acta.* 630, 119-130.
- 58-Mimnaugh E.G., Kennedy K.A., Trush M.A., Sinha B.K. (1985) Adriamycin-enhanced membrane lipid peroxidation in isolated rat nuclei. *Cancer Res.* 45, 3296-3304.
- 59-Okamoto K., Ogura R. (1985) Effects of vitamins on lipid peroxidation and suppression of DNA synthesis induced by adriamycin in Ehrlich cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 31, 129-134.
- 60-Senegas D. (1986) Cardiomyopathie et adriamycine: à propos d'un cas. *Revue de la littérature. Thèse de doctorat médecine. Paris XX.*
- 61-Lown J.W., Chen H.H., Plambeck J.A., Acton E.M. (1982) Further studies on the generation of reactive oxygen species from activated anthracyclines and the relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects. *Biochem. Pharmacol.* 31, 575-581.
- 62-Tong G.L., Henry D.W., Acton E.M. (1979) 5-iminodaunorubicin. Reduced cardiotoxic properties in an antitumor anthracycline. *J. Med. Chem.* 22, 36-39.
- 63-Dickinson A.C., Boutin M.G., Matsunaga N., Teres D. (1985) 4' deoxydoxorubicin and 4' demethoxydaunorubicin did not generate oxygen free radicals. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 26, 225.
- 64-Nohl H., Jordan W. (1983) OH<sup>-</sup> generation by adriamycin semi-quinone and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and explanation for the cardiotoxicity of anthracycline antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 149-152.
- 65-Doroshov J.H., Locker G.Y., Myers C.E. (1980) Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J.Clin. Inv.*, 65, 128-135.
- 66-Julicher R.H.M., Steirenberg L., Bast A., Riksen R.O.W., Koomen J.M., Woordhoek J. (1986) The role of lipid peroxidation in doxorubicin-induced cardiotoxicity studied in rat isolated heart. *J.Pharmacol.*, 38, 277-282.
- 67-Pollakis G., Goormaghtigh E., Delmelle M., Lion Y., Ruyschaert J.M. (1984) Adriamycin and derivatives interaction with the mitochondrial membrane: O<sub>2</sub> consumption and free radicals formation. *Res. Commun. Chem. Path. Pharm.*, 44, 445-459.
- 68-Doroshov J.H., Davies K.J. (1986) Redox cycling of anthracycline by cardiac mitochondria. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. *J.Biol.Chem.* 261, 3068-3074.
- 69-Doroshov J.H. (1983) Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res.*, 43, 460-472.
- 70-Davies J.A., Doroshov J.H., Hochstein P. (1983) Mitochondrial NADH dehydrogenase catalysed oxygen radical production by adriamycin and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin. *Febs Lett.* 153, 227-230.
- 71-Floyd R.A., Henderson R., Watson J.J., Wong P.K. (1986) Use of salicylate with high pressure liquid chromatography and electrochemical detection as a sensitive measure of hydroxyl free radical in adriamycin-treated rats. *J. Free Radical Biol.Med.* 2, 13-18.
- 72-Mimnaugh E.G., Trush M.A., Gram T.E. (1981) Stimulation of adriamycin of rat heart and liver microsomal NADPH-dependant lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 30 2797-2804.

- 73-Mimnaugh E.G., Trush M.A., Bhatnagar M., Theodore E. (1985) Enhancement of reactive oxygen-dependant mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin. *Biochem. Pharmacol.* 34, 847-856.
- 74-Thayer S.W. (1988) Evaluation of tissue indicators of oxydative stress, in rats treated chronically with adriamycin. *Biochem. Pharmacol.* 37, 2189-2194.
- 75-Koukay N., Mouhieddine S., Richard M.J., Arnaud J, De leiris J., Favier A.(1990) Influence of selenium on lipid peroxidation and cardiac functions in chronically adriamycin-treated rats. 353-359. In: *Antioxydants in therapy and preventive medicine*. Plenum Press, New-York and London.
- 76-Viles G., Winterbourn C. (1990) Thiol oxidation and inhibition of Ca-ATPase by adriamycin in rabbit heart microsome. *Biochem.Pharmacol.* 39, 769-774.
- 77-Mimnaugh E.G., Siddik Z.H., Drew R, Sikic B.I., Gram T.E. (1979) The effects of  $\alpha$ -tocopherol on the toxicity, disposition and metabolism of adriamycin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 49, 119-126.
- 78-Breed G.S., Zimmerman A.N., Dormans J.A., Pinedo H.M. (1980) Failure of the antioxydant Vitamin E to protect against Adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Res.* 40, 2033-2038.
- 79-Herman E.H., Ferrans V.J. (1983) Influence of vitamin E and ICRF-187 on chronic doxorubicin cardiotoxicity in miniature swine. *Lab. Invest.* 49, 69-77.
- 80-Legha S.S., Wang Y.M. (1982) Clinical and pharmacologic investigation of the effect of  $\alpha$ -tocopherol on adriamycin toxicity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 393, 411-418.
- 81-Whittaker J.A., Al-Ismaïl S.A.D. (1984) Effect of digoxine and vitamine E in preventing cardiac damage caused by doxorubicin in acute myeloid leukaemia. *British Med. J.* 288, 283-284.
- 82-Fugita K., Shinpo K., Yamada K., Sato T., Niimi H., Shamoto M., Nagatsu T., Takeuchi T., Umezawa H. (1982) Reduction of adriamycin toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. *Cancer Res.*, 42, 309-316.
- 83-Yoda Y., Nakazawa N., Abe T., Kawakami Z. (1986) Prevention of doxorubicin myocardial toxicity in mice by reduced glutathion. *Cancer Res.* 46, 2551-2556.
- 84-Unverferth D.V., Leier C.V., Balcerzak S.P., Hamlin R.L. (1985) Usefulness of a free radical scavenger in preventing doxorubicin-induced heart failure in dogs. *Am. J. Cardiol.* 56, 157-161.
- 85-Herman E.H., Ferrans V.J. (1981) Reduction of chronic doxorubicin cardiotoxicity in dogs by pretreatment with 1,2 bis(3-5 dioxopiperaziny) propane (ICRF 187). *Cancer Res.*, 41, 3436-3440.
- 86-Herman E.H. (1981) Reduction of chronic daunorubicin cardiotoxicity by ICRF 187 in rabbits. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 31, 85-97.
- 87-Alderton P., Gross J., Green M.D. (1990) Role of 1,2-bis(3,5-dioxopiperaziny-1-yl)propane (ICRF-187) in modulating free radical scavenging enzymes in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cancer Res.* 50, 5136-5142.
- 88-Speyer J.L., Green M.D., Wernz J., Rey M., Sanger J. Kramer E., Ferrans V. (1992) ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 10, 117-127.
- 89-Lown J.W., Sim S.K., Chen H. (1978) Hydroxyl radical production by free and DNA bound aminoquinone antibiotics and its role in DNA degradation. *Can. J. Biochem.*, 56, 1042-1047.

- 90-Kalyanaraman B., Perez-Reyes E., Mason R.P.(1980) Spin trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs. *Biochem. Biophys. Acta.*, 630, 119-130.
- 91-Pan S.S., Andrews P.A., Glover C.J., Bachur N.R. (1984) Reductive activation of mitomycin C and mitomycin metabolites catalysed by NADPH cytochrome P-450 reductase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 259, 959-966.
- 92-Trush M.A., Mimnaugh E.G., Ginsburg E., Gram T.E. (1982) Studies on the in vivo interaction of mitomycin C, nitrofurantoin and paraquat with pulmonary microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 31, 805-814
- 93-Komiyama T., Kikuchi T., Sugiura Y. (1986) Interaction of anticancer quinone drugs, aclacinomycin A, adriamycin, carbazilquinone and mitomycin C with NADPH cytochrome P 450 reductase, xanthine-oxidase and oxygen. *J. Pharmacobiodyn.*, 9, 651-664.
- 94-Gutteridge J.M., Quinlan G.J., Wilkins S. (1984) Mitomycin C induced deoxyribose degradation inhibited by superoxyde dismutase. A reaction involving iron, hydroxyle and semiquinone radicals. *Febs Lett*, 167, 37-41.
- 95-Pristos C.A., Sartorelli A.C. (1986) Generation of reactive oxygen radicals through bioactivation of mitomycin antibiotics. *Cancer Res.* 46, 3528-3532.
- 96-Pristos C.A., Keyes S.R., Sartorelli A.C. (1986) Role of oxygen radicals in the toxicity of mitomycin antibiotics to EMT6 tumor cell. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 27, 233, 1760-1764.
- 97-Krishna M.C., De graff W., Tamura S., Gonzales F.J., Samum A., Russo A., Mitchell J.B. (1991) Mechanisms of hypoxic and aerobic cytotoxicity of mitomycin C in chinese hamster V79 cells. *Cancer Res.* 6622-6628.
- 98-Karash E.D., Novak R.F. (1981) Anthracenedione activation by NADPH cytochrome P450 reductase, comparison with anthracyclines. *Biochem. Pharmacol.* 30, 2881-2884.
- 99-Sinha B.K., Motten A.G., Hanck K.W. (1983) The electrochemical reduction of 1,4-bis-(2-(2-hydroxyethyl)-amino)ethylamino-anthracenedione and daunomycin biochemical signifiacnce in superoxide formation. *Chem. Biol. Interact.* 43, 371-377.
- 100-Karasch E.D., Novak R.F. (1983) Mitoxantrone and amenantrone: metabolic activation and effects on lipid peroxidation. *Preclinical Pharmacol. and Exp. Therap.* 12, 257-263.
- 101-Karasch E.D., Novak R.F. (1982) Inhibition of adriamycin-stimulated microsomal lipid peroxidation by mitoxantrone and amenantrone, two new anthracenedione antineoplastic agents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108, 1346-1352.
- 102-Karasch E.D., Novak R.F. (1984) Spectroscopic evidence for anthracenedione antineoplastic agent self-association and complex formation with flavin nucleotides. *Arch. Biochem. Biophys.* 234, 497-512.
- 103-Fisher G., Patterson L.H. (1991) DNA strand breakage by peroxidase-activated mitoxantrone. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 65-68.
- 104-Bachur N.R., Gee M.V., Gordon S.L.(1978) Enzymatic activation of actinomycin D to free radical state. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 19, 75.
- 105-Flitter W.D., Mason R.P. (1988) The enzymatic reduction of actinomycin D to a free radical species. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 632-639.
- 106-Cox M.G., Sinha B.K. (1979) Stimulation of superoxide by actinomycin D and phenoxazone analogues to a free radical species. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 632-639.

- 107-Kasai H., Naganawa H., Takita H., Umezawa H. (1978) Interaction of bleomycin with nucleic acids, preferential binding to guanine base and electrostatic effect of the terminal amine. *J. Antibiot.* 31, 1316-1320.
- 108-Housin. R. (1985) Analogues synthétiques de la bléomycine. Thèse de doctorat es sciences pharmaceutiques. Faculté pharmacie. Lille.
- 109-Takita T., Muraoka Y., Nakatani T., Fujii Y. (1978) Chemistry of bleomycin. Metal complex of bleomycin and its implication for the mechanism of bleomycin action. *J. Antibiot.* 31, 1073-1077.
- 110-Sausville E.A., Peisach J., Horwitz S.B. (1978) Effect of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by bleomycin. *Biochemistry.* 17, 2740-2746.
- 111-Dedon P.C., Goldberg H.J. (1992) Free radical mechanisms involved in the formation of sequence-dependent bistranded DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin, neocarzinostatin, calicheamicin. *Res. Tox.* 5, 311-332.
- 112-Sugira Y., Kikuchi K., (1978) Formation of superoxide and hydroxyl radicals in iron (II) bleomycin oxygen system. ESR detection by spin trapping. *J. Antib.* 12, 1310-1312.
- 113-Scheulen M.E., Kappus H., Thyssen D., Schmidt G.C. (1981) Redox cycling of Fe(III)-bleomycin by NADPH cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Pharmacol.* 34, 3091-3094.
- 114-Giloni L., Takeshita M., Johnson F., Iden C., Grollman A.P. (1981) Bleomycin-induced strand scission of DNA. Mechanism of deoxyribose cleavage. *J. Biol. Chem.* 26, 8608-8615.
- 115-Gajewski E, Aruoma O.I., Dizdaroglu M., Halliwell B. (1991) Bleomycin-dependent damage to the bases in DNA is a minor side reaction. *Biochemistry.* 30, 2444-2448.
- 116-Doelman C.J., Bast A. (1990) Oxygen radicals in lung pathology. *Free Rad. Biol. Med.* 9, 381-400.
- 117-Hay J.G., Haslam P.L., Turner-Warwick M., Laurent G.J. (1987) The effect of iron and desferrioxamine on the lung injury induced by intravenous bleomycin and hyperoxia. *Free Rad. Res. Commun.* 4, 109-114.
- 118-Nakamura H., Sato S., Takahashi K. (1989) Effects of vitamin E deficiency on bleomycin induced pulmonary fibrosis in the hamster. *Exp. Lung Res.*, 15, 315-329.
- 119-Hay J., Shahzeidi S., Laurent G. (1991) Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Arch. Toxicol.* 65, 81-94.
- 120-Filderman A.E., Genovese L.A., Lazo J.S. (1988) Alteration in pulmonary protective enzymes following systemic bleomycin treatment in mice. *Biochem. Pharmacol.* 37, 1111-1116.
- 121-Giri S.N., Chen Z.L., Youker W.R., Schiedt M.J. (1983) Effects of intratracheal administration of bleomycin on GSH shuttle enzymes, catalase, lipid peroxidation and collagen content in the lung of hamster. *Toxicol. Appl. pharmacol.* 71, 132-141.
- 122-Bailly C., Beauvillain J.C., Bernier J.L., Henichart J.P. (1990) Plasma membrane perturbation of KB3 cells induced by bleomycin iron complex. *Cancer Res.*, 50, 385-392.
- 123-Kikuchi H., Tetsuka T. (1992) On the mechanism of lipooxygenase-like action of bleomycin-iron complexes. *J. Antib.*, 45, 548-555.



- 124-Chandler D.B., Barton J.C., Briggs D.D., Butler T.W., Kennedy J.I., Fulmer J.D. (1988) Effect of iron deficiency on bleomycin induced fibrosis in hamster. *Fed. Proc.*, 46, 1149.
- 125-Passero M.A., Di-Santo L. (1988) Peroxidation of arachidonic acid by bleomycin. A possible mechanism of bleomycin pulmonary toxicity. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 29: A 9994.
- 126-Jordana M., Richard C, Irving L.B., Gauldie J. (1988) Spontaneous in vitro release of alveolar macrophage cytokines after the intratracheal instillation of bleomycin in rats. Characterisation and kinetic studies. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 1135-1140.
- 127-Sloman D.O., Costabella D.M., Roth M., Werlen G., Polla B.S. (1990) Bleomycin primes monocytes-macrophage for superoxide production. *Europ. Resp. J.*, 3, 772-778.
- 128-Lazo J.S., Sebti S.M., Filderman A.E. (1987) Metabolism of bleomycin and bleomycin-like compounds. In Powis G., Prough R.A. *Metabolism and action of anticancer drugs*. Eds Taylor and Francis London.
- 129-Lazo J.S., Humphreys C.J. (1983) Lack of metabolism as the biochemical basis of bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 3064-3068.
- 130-Takahashi K. (1989) Pulmonary fibrosis and antioxydant agents. *Nippon Kyoby*, 27, 428-433.
- 131-Pepin M.J., Langner R.O. (1985) Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2386-2389.
- 132-Haschek W.M., Baer K.E., Rutherford J.E. Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on pulmonary fibrosis in rats and mice. *Toxicology*. 54, 197-205.
- 133-Wand H.E., Nicholson A., Berend N. (1987) Failure of systemic N-acetylcysteine to protect the rat lung against bleomycin toxicity. *Pathology*. 19, 353-360.
- 134-Shahzeidi S., Sarnstrand B., Jeffery P.K., Mc Anulty R.J, Laurent G.J. (1991) Oral N-Acetylcysteine reduces bleomycin-induced collagen deposition in the lungs of mice. *Eur. Respir. J.* 4, 845-852.
- 135-Chandler D.B., Buller T.W., Briggs D.D., Gizzle N.E., Barton J.C., Fulmer J.D. (1988) Modulation of development of bleomycin-induced fibrosis by deferoxamine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92, 358-367.
- 136-Cross C.E., Warren D., Gerriets J.E., Wilson D.W., Halliwell B., Last J.A. (1985) Deferoxamine injection does not affect bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J. Lab. Clin. Med.*, 106, 433-438.
- 137-Tryka A.F. (1989) ICRF 187 and polyhydroxyphenyl derivatives fail to protect against bleomycin-induced lung injury. *toxicology*. 59, 127-138.
- 138-Sinha B.K., Trush M.A. (1983) Free radical of VP-16 and inhibition of anthracyclin-induced lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3495-3498.
- 139-Haim N., Nemeč J., Roman J., Sinha B.K. (1987) In vitro metabolism of etoposide (VP-16-213) by liver microsomes and irreversible binding of reactive intermediates to microsomal proteins. *Biochem. Pharmacol.* 36, 527-536.
- 140-Haim N., Nemeč J., Roman J., Sinha B.K. (1987) Peroxydase catalysed metabolism of etoposide (VP-16-213) and covalent binding of reactive intermediates to cellular macromolecules. *Cancer Res.* 47, 5835-5840.
- 141-Sinha B.K., Eliot H.M., Kalyanaraman B. (1988) Iron-dependent hydroxyl radical formation and DNA damage from a novel metabolite of the clinically active antitumor drug VP-16. *Febs Lett.* 227, 240-244.

- 142-Mans D.R., Lafleur M.V., Westmijze E.J., Van Maanen J.M., Van Schaik M.A., Lankelma J. (1991) Formation of different reaction products with single and double-stranded DNA by the orthoquinone and the semi-quinone-free radical of etoposide (VP-16-233). *Biochem. Pharmacol.* 42, 2131-2139.
- 143-Auclair C., Hyland K., Paoletti C. (1983) Autoxidation of the antitumor drug 9-hydroxyellipticine and its derivatives. *J. Med. Chem.* 26, 1438-1444.
- 144-Dugue B., Auclair C., Meunier B. (1988) Covalent binding of elliptinium acetate (NCS 264137) to nucleic acid of L2110 cells in culture. *Cancer Res.* 46, 3828-3833.
- 145-Dadoun C., Raguenez-Viotte G. (1990) Celliptium induced nephrotoxicity and lipid peroxydation in rat renal cortex. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 27, 178-186.
- 146-Thomas N., Raguenez-Viotte G., Dieber-Rotheneder M. (1991) Time course study of lipid peroxidation induced by N2-methyl-9- hydroxyellipticinium acetate or celliptium in rat renal cortex. *Pharmacol. Toxicol.* 69, 112-116.
- 147-Gergel D., Misik V., Ondrias K. (1992) Effect of cisplatin, carboplatin and stobadine on lipid peroxidation of kidney homogenate and phosphatidylcholine liposomes. *Physiol. Res.* 41, 129-134.
- 148-Hannemann J., Baumann K. (1988) Cis-platine-induced lipid peroxydation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney cortex: different effects of antioxydants and radical scavengers. 51, 119-132.
- 149-Kameyama Y., Gemba M. (1991) The iron chelator deferoxamine prevents cisplatin induced lipid peroxidation in rat cortical slices. *Jpn. J. Pharmacol.* 57, 259-262.
- 150-Sohdi-A, Gupta-P.(1986) Increased release of hydrogen peroxide and superoxide anion by murine macrophage in vitro after cisplatin treatment. *Int. J. Immunopharmacol.*, 8, 709-714.
- 151-Sadzuka Y., Shogi T, Takino Y. (1992) Effect of cisplatin on the activity of enzymes wich protect against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 43, 1872-1875.
- 152-Zangh J.G., Lindup W.E. (1993) Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. *Biochem. Pharmacol.* 45, 2215-2222
- 153-Zhang J.G., Lindup W.E. (1994) Cisplatin nephrotoxicity: decreases in mitochondrial protein sulfphydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slice. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1127-1135.
- 154-Nakano S., Gemba M. (1989) Potentation of cisplatin-induced lipid peroxidation in rat kidney cortical slices by glutathion depletion. *Jpn J. Pharmacol.* 50, 87-92.
- 155-Bompart G.(1989) Cisplatin-induced changes in cytochrome P 450, lipid peroxydation and drug-metabolizing enzyme activities in rat kidney cortex. *Toxicol. Lett.* 48, 193-199.
- 156-Sinha B.K. (1984) Metabolic activation of procarbazine. Evidence for carbon-centered free radical intermediates. *Biochem. Pharmacol.* 17, 2777-2781.
- 157-Edo K., Mizugaki M., Koide Y., Seto H., Furikata K., Otake N., Ishida N. (1985) The structure of neocarzinostatin chromophore possessing novel bicyclo (7,3,0) didecadiyne system. *Tetrahedron Lett* 26, 331-334.
- 158-Dasgulta D., Golberg I.M. (1985) Mode of reversible binding of neocarzinostatin chromophore to DNA. Evidence of binding via the minor groove. *Biochemistry* 24, 6913-6920.

- 159-Chin D.H., Golberg I.H. (1986) Production of superoxide free radical by neocarzinostatin and its possible role in DNA damage. *Biochemistry* 25, 1009-1015.
- 160-Keyse S.M., Rex M.T. (1989) Heme oxygenase is the major 32 kDa stress protein induced in human skin fibroblast by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 99-103.
- 161-Stocker R., Yamato Y., Mc Donagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043-1046.
- 162-Keyse S.M., Tyrrel R.M. (1990) Induction of the heme oxygenase in human skin fibroblasts by hydrogen peroxide and UVA (365 nm) radiation: evidence for the involvement of the hydroxyl radical. *Carcinogenesis*. 11, 787- 791.
- 163-Wissel P.S., Drummond G.S., Kappas A. (1990) Protective effect of Sn protoporphyrin against doxorubicin induced perturbation of heme metabolism. *Life Sci.* 47, 1595-1599.
- 164-Johson R.N., Kucey B.L. (1988) Competitive inhibition of HSP70 gene expression cause thermosensitivity. *Science.* 242, 1551-1554.
- 165-Donati R.A., Slosman D.O., Polla B. (1990) Oxidative injury and the heat shock response. *Biochem. Pharmacol.* 40, 2571-2577.
- 166-Nowak S.T.(1985) Synthetis of stress protein following transient ischemia in the gerbil. *J.Neurochem.* 45, 1635-1641.
- 167-Kato H., Liu Y., Kogure K., Kato K. (1994) Induction of 27 kDa heat shock protein following cerebral ischemia in rat model of ischemic tolerance. *Brain Research.* 634, 235-244.
- 168-Burdon R.H., Gill V.M., Rice Evans C. (1987) Oxidative stress and heat shock protein induction in human cells. *Free Radical Res. Commun.* 3, 129-139.
- 169-Spitz D.R., Dewey W.C., Li G.C. (1987) Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxyde in Chinese hamster fibroblast. *J. Cell. Physiol.* 131, 364-373.
- 170-Ananthan J., Golberg A.L., Voellmy R. (1986) Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232, 522-524.
- 171-Ciocca R.D., Fuqua W.A., Lock Lim S., Toft D.O., Welch W.J., Mc Guire W.L. (1992) Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* 52, 3448-3454.
- 172-Huot J., Roy G., Lambert H., Chretien P., Landry J. (1991) Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cell expressing the human 27,000 heat shock protein. *Cancer Res.* 51, 5245-5252.
- 173-Osterreich S., Weng C.N., Qui M., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Fuqua A.W. (1993) The small heat shock protein HSP27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer lines. *Cancer Res.* 53, 4443-4448.
- 174-Donalson S.S., Cordon L.F., Hahn G.M. (1978) Protective effect of hyperthermia against the cytotoxicity of actinomycin D on Chinese hamster cells. *Cancer Treat. Rep.* 62, 1489-1495.
- 175-Huber S.A. (1992) Heat shock protein induction in Adriamycin and picornavirus infected cardiocytes. *Lab. Invest.* 62, 218-224.

- 176-Osterreich S., Schunck H., Rainer B., Bielka H. (1991) Cisplatin induces the small heat shock protein HSP25 and thermotolerance in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 180, 243-248.
- 177-Moseley P.L., York S.J., York J. (1989) Bleomycin induces the HSP 70 heat shock promoter in cultured cells. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 1, 89-93.
- 178-Croop J.M., Gros P., Housman D.E. (1988) Genetics of multidrug resistance. *J. Clin. Inv.* 81, 1303-1309.
- 179-Robert J. (1992) Mécanismes moléculaires de la résistance aux médicaments anticancéreux. *Regard sur la biochimie* 1, 35-43.
- 180-Roninson I.B., Albeson H.T., Housman D.E., Howell N., Varsharsky A. (1984) Amplification of specific DNA sequences correlates with multidrug resistance in Chinese hamster cells. *Nature* 309, 626-628.
- 181-Raviv Y., Pollard H.B., Bruggeman E.P., Pastan I., Gottesman M.M. (1990) Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.* 265, 3975-3980.
- 182-Beck W.T. (1987) The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2879-2887.
- 183-Tsuchida S., Sato K. (1992) Glutathione transferase and cancer. *Critical Review. Mol. Biol.* 27, 337-384.
- 184-Lowie K.G., Behrens B.C., Kinsella T.J., Hamilton T.C., Grotzinger K.R., Mc Koy W.M., Winker M.A., Ozol R.F. (1985) Radiation survival parameters of antineoplastic drug sensitive and resistant human ovarian cancer cell lines and their modification by buthionine sulfoximine. *Cancer Res.* 45, 2110-2115.
- 185-Meijer C., Mulder N.H., Hosper G.A., Uges D.R., De-Vries E.G. (1990) The rôle of glutathione in resistance to cisplatin in a human lung cancer cell line. *Br J. Cancer* 62, 72-77.
- 186-Spitz D.R., Phillips J.W., Adam D.T., Sherman C.M., Deen D.E., Li G.C. (1992) Cellular resistance to oxidative stress is accompanied by resistance to cisplatin. The significance of increased catalase activity and total glutathione content in hydrogen peroxide-resistant fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 156, 72-79.
- 187-Gupta V., Singh S.V., Ahmad H., Medh R.D., Awasthi Y.C. (1987) Glutathione and glutathione S transferase in a human plasma cell line resistant to mephalan *Biochem. Pharmacol.* 38, 1993-2000.
- 188-Robson C.N., Lewis A.D., Wolf C.R., Hayes J.D., Hall A., Proctor S.J., Harris A.L., Hickson I.D. (1987) Reduced levels of drug-induced DNA cross-linking in nitrogen mustard resistant chinese hamster ovary cells expressing elevated glutathione-S-transferase activity. *Cancer Res.* 47, 6022-6027.
- 189-Lewis A.D., Hickson I.D., Robson C.N., Harris A.L., Hayers J.D., Griffiths S.A., Mason M.M., Hall A.E., Moss J.E., Wolf R. (1988) Amplification and increased expression of  $\alpha$  class glutathione-S-transferase encoding genes associated with resistance to nitrogen mustard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8511-8515.
- 190-Wang Y.Y., Teicher B.A., Shea T.C., Holden S.A., Robse K.W., Al Achi A., Henner W.D. (1988) Cross resistance and glutathione-S-transferase  $\pi$  levels among four human melanoma cell lines selected for alkylating agent resistance. *Cancer Res.* 49, 6185-6192.
- 191-Smith M.T., Evans C.J., Doane Seltzer P., Castro V.M., Tahir M.K., Mannervik B. (1989) Denitrosation of a 1-3 bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea by class  $\mu$  glutathione transferase and its role in cellular resistance in rat brain tumor cells *Cancer Res.* 49, 2651-2655.
- 192-Batist G., Tulpule A., Sinha B.K., Katki A.G., Myers C.E., Cowan K.H. (1986) Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multi-drug resistant human breast cancer cell. *J. Biol. Chem.* 33, 15544-15549.

- 193-Singh S.V., Nair S., Ahmad H., Awasthi Y.C., Krishan A. (1989) Glutathion S transferases and glutathion peroxidases in doxorubicin-resistant murine leukemic P388 cells. *Biochem. Pharmacol.* 20, 3505-3510.
- 194-Lee F.Y., Sciandra J., Sieman D.W. (1989) A study of the mechanism of resistance to adriamycin. Glutathione metabolism, P-glycoprotein expression, and drug transport. *Biochem. Pharmacol.* 21, 3697-3705.
- 195-Sinha B.K., Katki A.G., Batist G., Cowan K.H., Myers C.E. (1987) Differential formation of hydroxyl radical by adriamycin in sensitive and resistant MCF7 human breast tumor cells. Implication for the mechanism of action. *Biochemistry* 26, 3776-3781.
- 196-Bigbee W.L., Wyrobek A.J., Langlois R.G., Jensen R.H., Everson R.B. (1990) The effect of chemotherapy on the in vivo frequency of glycophorin A "null" variant erythrocytes. *Mutation Res.*, 240, 165-175.
- 197-Perera F. P., Motzer R. J., Tang D., Reed E., Parker R., Warbuton D., O'Neil P., Abertini R., Bigbee W.L., Jensen R.H., Santella R., Tsai W.-Y., Simon-Cerejido G., Randall C., Bosl, G. (1992) Multiple biological markers in germ cell tumor patients treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Res*, 52, 3558-3565.
- 198-Grant S.G., Bigbee W.L. (1994) Bone marrow somatic mutation after genotoxic cancer therapy, *Lancet* 343, 1507-1508.
- 199-Gary M.W., Weisburger J.H. (1991) Chemical carcinogenesis. 127-199. In: Casarett and Doull's Toxicology. Pergamon Press.
- 200-Bienvenu P., Gasparutto D. (1993) Stimulation de la peroxydation lipidique in vitro par la vitamine K1, la chlorméthine et l'orellanine, au moyen d'un système à base de microsomes hépatiques et d'un générateur de NADPH. *S.S.A. Trav. Scient.* n°14.
- 201-Masuda H., Tanaka T., Takahama U. (1994) Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Comms.*, 203, 1175-1180.



AUTORISATION D'IMPRESSION  
ET DE  
SOUTENANCE

De la Thèse dont l'intitulé est :

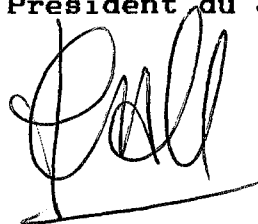
Implication des radicaux libres dans  
l'efficacité et la toxicité des agents anticancéreux.

CANDIDAT : M SANCHEZ Mathieu

Vu

GRENOBLE, le 21 octobre 1994

Le Président du Jury



Vu

GRENOBLE, le 21/10/1994

P/ Le Président de l'Université  
Joseph FOURIER - GRENOBLE I  
Sciences. Technologie. Médecine

Le Directeur de l'U.F.R.  
Pharmacie

J. ROCHAT



