



HAL
open science

Susceptibilité différentielle des microsomes tissulaires de rats à la peroxydation induite par l'adriamycine : relation avec la cardiotoxicité

Jean-Yves Thérin

► **To cite this version:**

Jean-Yves Thérin. Susceptibilité différentielle des microsomes tissulaires de rats à la peroxydation induite par l'adriamycine : relation avec la cardiotoxicité. Sciences pharmaceutiques. 1994. dumas-02180505

HAL Id: dumas-02180505

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02180505v1>

Submitted on 18 Jul 2019

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

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>

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1 -
U.F.R. DE PHARMACIE**
Domaine de la Merci - LA TRONCHE -

Année 1994

Mémoire n°

7007

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement

le 15 Février 1994

Par Monsieur **Jean-Yves THERIN**
[Données à caractère personnel]

Conformément aux dispositions de l'Arrêté
du 4 Octobre 1988 tient lieu de :

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**SUSCEPTIBILITE DIFFERENTIELLE DES
MICROSOMES TISSULAIRES DE RATS A LA
PEROXYDATION INDUITE PAR L'ADRIAMYCINE:
Relation avec la cardiotoxicité**

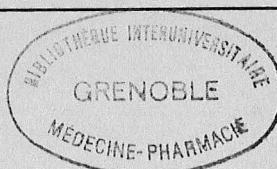
JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur A. FAVIER

MEMBRES

Monsieur le Professeur R. SCHAERER
Monsieur le Docteur C. COUDRAY
Monsieur le Docteur P. FAURE



**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1 -
U.F.R. DE PHARMACIE
Domaine de la Merci - LA TRONCHE -**

Année 1994

Mémoire n°

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement

le 15 Février 1994

Par Monsieur **Jean-Yves THERIN**

[Données à caractère personnel]

Conformément aux dispositions de l'Arrêté
du 4 Octobre 1988 tient lieu de :

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**SUSCEPTIBILITE DIFFERENTIELLE DES
MICROSOMES TISSULAIRES DE RATS A LA
PEROXYDATION INDUITE PAR L'ADRIAMYCINE:
Relation avec la cardiotoxicité**

JURY

PRESIDENT

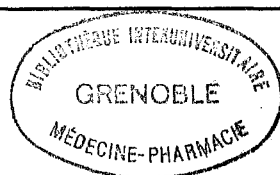
Monsieur le Professeur A. FAVIER

MEMBRES

Monsieur le Professeur R. SCHAEERER

Monsieur le Docteur C. COUDRAY

Monsieur le Docteur P. FAURE



A mes parents

*A Nathalie et sa famille
A Manon et Thomas*

A tous mes amis

A NOTRE PRESIDENT DU JURY,

Monsieur le Professeur A. FAVIER

*Nous avons pu tout au long de nos études apprécier son
enthousiasme et ses compétences.*

Il nous fait l'honneur d'accepter d'être le Président de notre jury.

Nous lui exprimons tout notre respect et toute notre gratitude.

A Monsieur le Professeur R. SCHAEERER

*Nous sommes très touchés de l'honneur que vous nous faites
en acceptant de juger ce travail.*

*Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde
reconnaissance et de nos sincères remerciements.*

A Monsieur le Docteur C. COUDRAY

qui a suivi et dirigé notre travail.

Nous lui adressons ici tous nos remerciements.

A Monsieur le Docteur P. FAURE

Nous tenons à le remercier tout particulièrement pour les précieux conseils qu'il nous donna et pour la disponibilité dont il fit preuve.

Nous tenons enfin à remercier les techniciennes du laboratoire de Biochimie C, secteur des vitamines et de l'HPLC, ainsi que celles du laboratoire de Biochimie-Pharmacie de la faculté.

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	1
L'ADRIAMYCINE	
1. LA THERAPIE ANTICANCEREUSE	2
2. PARTICULARITES DES TISSUS CANCEREUX	2
2.1. Le génome de la cellule cancéreuse	2
2.2. Cinétique des cellules et tissus cancéreux	3
3. L'ADRIAMYCINE	3
3.1. Indications	4
3.2. Posologies	5
3.3. Pharmacocinétique	5
3.3.1. Voies d'administration	5
3.3.2. Distribution	5
3.3.3. Métabolisation	6
3.3.4. Elimination	6
3.4. Modes d'action	6
3.4.1. Intercalation à l'ADN	7
3.4.2. Inhibition de la topoisomérase II	7
3.4.3. Interaction avec les membranes cellulaires	7
3.4.4. Production de radicaux libres	8
3.5. Effets secondaires de l'adriamycine	8
3.6. Résistance tumorale à l'adriamycine	10
3.6.1. Généralités sur la résistance tumorale	10
3.6.2. Résistance tumorale aux anthracyclines	11
3.6.2.1. Augmentation de l'efflux cellulaire de la drogue	11
3.6.2.2. Modification qualitative de la cible	12
3.6.2.3. Augmentation des systèmes de défense antiradicalaires	12
LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	
1. LA MOLECULE D'OXYGENE	12
2. LES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGENE	12
3. LES DIFFERENTES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	13
3.1. L'oxygène singulet	13
3.2. L'anion superoxyde	14
3.3. Le peroxyde d'hydrogène	14
3.4. Le radical hydroxyle	14
3.5. Les radicaux peroxydes et alcoxydes	15
3.6. L'ozone	15
4. DIFFERENTES SOURCES DE PRODUCTION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	17
5. CIBLES ET DEGATS ENGENDRES PAR LES ESPECES REACTIVES OXYGENES	18
5.1. Alteration des proteines	18
5.2. Alteration des acides nucléiques	20
5.3. Alteration des lipides membranaires	20
5.3.1. Le processus de peroxydation lipidique	20
5.3.1.1. Initiation	20
5.3.1.2. Propagation	21
5.3.1.3. Terminaison	21
5.3.2 Conséquences cellulaires de la production de radicaux libres	23

	Page
6. MECANISMES DE DETOXIFICATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	24
6.1. Les enzymes de la lutte antiradicalaire	25
6.1.1. Les enzymes de destruction des superoxydes	25
6.1.1.1. Les superoxydes dismutases	25
6.1.1.2. Autres enzymes	25
6.1.1.3. La céruléoplasmine	26
6.1.2. Les enzymes de destruction des peroxydes	26
6.1.2.1. La catalase	26
6.1.2.2. Les glutathion peroxydases	26
6.1.2.3. Les glutathion S-transférases	27
6.2. Les systèmes de défense non enzymatiques	27
6.2.1. Les vitamines liposolubles	27
6.2.1.1. La vitamine E	27
6.2.1.2. Les caroténoïdes	27
6.2.1.3. La vitamine A et l'acide rétinolique	28
6.2.2. Les vitamines hydrosolubles et autres scavengers	28
6.2.2.1. L'acide ascorbique	28
6.2.2.2. Le glutathion réduit	28
6.2.2.3. Les métallothionéines	28
6.2.2.4. Autres molécules	28

ADRIAMYCINE ET PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES

1. MECANISMES DE PRODUCTION RADICALAIRE	30
1.1. Structure de l'adriamycine	30
1.2. Le cycle d'oxydo-réduction de l'adriamycine	31
1.2.1. Les enzymes du cycle d'oxydo-réduction	31
1.2.2. Les espèces radicalaires produites lors de l'oxydo-réduction	31
1.3. Adriamycine et complexes métalliques	33
1.3.1. Les complexes ferriques	34
1.3.1.1. Sources de fer	34
1.3.1.2. Production radicalaire par le complexe adriamycine-fer	34
1.3.2. Autres complexes métalliques	36
2. ROLE DES RADICAUX LIBRES DANS L'ACTIVITE ANTITUMORALE DE L'ADRIAMYCINE	37
2.1. Alkylation de l'ADN par les produits de réduction de l'adriamycine	37
2.2. Dégradation de l'ADN par les espèces réactives oxygénées issues du cycle d'oxydo-réduction	38
2.3. Lésions de l'ADN induites par le complexe fer- adriamycine	38
3. ROLE DES RADICAUX LIBRES DANS LA CARDIOTOXICITE DE L'ADRIAMYCINE	39
3.1. Toxicité sur les organelles	39
3.1.1. Altération du réticulum sarcoplasmique	39
3.1.2. Altération des mitochondries	40
3.1.3. Lésions ultrastructurales des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique	41
3.2. Toxicité myocardique in vivo	42
3.3. Effets indirects des ERO dans la cardiotoxicité de l'adriamycine	42
3.4. Effets des antioxydants sur le stress oxydatif induit par l'adriamycine	43
4. RESISTANCE TUMORALE ET SYSTEMES DE DEFENSE ANTIRADICALAIRE	44
4.1. La glutathion S-transférase	45
4.2. La glutathion peroxydase séléno-dépendante	45
4.3. Quelques exemples	46

RESULTATS PERSONNELS

1. INTRODUCTION	48
2. MATERIEL ET METHODES	49
2.1. Le modèle expérimental: les microsomes tissulaires de rats	49
2.1.1. Préparation des microsomes tissulaires	49
2.2. Etude de la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine	
2.2.1. Techniques de dosage et conditions opératoires	51
2.2.1.1. Dosage du MDA	51
2.2.1.2. Dosage des groupements thiols	52
2.2.2. Choix des conditions opératoires: détermination de la concentration optimale en NADPH	53
2.2.3. Etude des peroxydations lipidiques et protéiques induites par l'adriamycine	54
2.3. Détection des espèces réactives oxygénées produites par l'adriamycine par résonance paramagnétique électronique	54
2.4. Effet des antioxydants sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine	55
2.5. Détermination de l'activité cytochrome P-450 réductase microsomale	55
2.6. Dosage des acides gras polyinsaturés microsomaux	56
2.7. Dosage du fer et du zinc microsomaux	56
2.8. Dosage de la vitamine E microsomale	57
3. RESULTATS	58
3.1. Optimisation des conditions opératoires	
3.2. Etude de la peroxydation induite par l'adriamycine	58
3.2.1. Sur les microsomes cardiaques	58
3.2.2. Sur les microsomes hépatiques	60
3.2.3. Sur les microsomes rénaux	61
3.2.4. Sur les microsomes pulmonaires	63
3.2.5. Récapitulatif sur les différents microsomes	64
3.3. Détermination des ERO produites par l'ADR par RPE.	67
3.4. Effet des antioxydants sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine	68
3.4.1. Effet de l'acide rétinolique	69
3.4.2. Effet de la N-acétylcystéine	70
3.5. Détermination de l'activité cytochrome P-450 réductase microsomale	71
3.6. Dosage des acides gras polyinsaturés microsomaux	71
3.7. Dosage du fer et du zinc microsomaux	71
3.8. Dosage de la vitamine E microsomale	72
4. DISCUSSION DES RESULTATS	73
CONCLUSION	78
BIBLIOGRAPHIE	
LISTE DES ABREVIATIONS	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cancer demeure actuellement l'une des premières causes de décès en France (120000 par an). Pour le traiter, le clinicien dispose de plusieurs moyens qu'il va le plus souvent utiliser en conjonction et qui sont la chimiothérapie, la radiothérapie, et l'exérèse chirurgicale.

La chimiothérapie anticancéreuse a permis un gain de 10% en terme de taux global de guérison. Toutefois, malgré des progrès considérables, son utilisation est limitée par l'importante toxicité des produits employés jusqu'à présent. C'est pourquoi depuis quelques années, plusieurs voies de recherche se sont développées pour tenter d'améliorer le rapport efficacité/tolérance de ces produits.

Parmi ces axes de recherche, les liens de certains anticancéreux avec la biochimie de l'oxygène ont suscité un intérêt certain. Certaines drogues anticancéreuses semblent en effet en mesure de produire des espèces réactives de l'oxygène susceptibles d'exercer des effets délétères étendus non spécifiques aux cellules tumorales.

L'adriamycine est un médicament très efficace sur un grand nombre de cancers. Cependant, son emploi en clinique est souvent limité par le risque de survenue d'une cardiotoxicité cumulative dose-dépendante irréversible. L'adriamycine fait partie des cytotoxiques capables de produire des espèces réactives oxygénées et la toxicité cardiaque pourrait être due au stress oxydatif engendré par cette drogue dans ce tissu.

Afin de mieux comprendre les raisons de la prédominance de cette cardiotoxicité, nous avons choisi de comparer la sensibilité à l'adriamycine des microsomes cardiaques avec d'autres microsomes tissulaires. Ainsi nous avons mesuré dans les différentes préparations microsomales les attaques radicalaires lipidiques et protéiques faisant suite à l'activation de l'adriamycine par les enzymes du système microsomal. Dans un second temps, nous avons évalué les effets de deux antioxydants susceptibles *in vivo* de protéger les tissus. Pour expliquer les différences de toxicité selon les microsomes, nous avons également mesuré le statut en antioxydants (minéraux, vitamines) ainsi que la teneur en substrat de la peroxydation dans les différentes préparations microsomales. Les résultats de ces expériences nous conduisent à des perspectives sur l'utilisation de cette molécule que nous développerons en conclusion de ce mémoire.

GENERALITES SUR
L'ADRIAMYCINE

L'ADRIAMYCINE

1. GENERALITES SUR LA THERAPIE ANTICANCEREUSE.

Peu de familles médicamenteuses ont connu un développement aussi important et rapide que celle des agents anticancéreux. La constatation que les effets du gaz moutarde comportaient une destruction des cellules sanguines et médullaires a conduit à l'étude, dès 1943 aux Etats-unis, des premiers agents alkylants.

Le nombre de sujets atteints de cancer croit de 1% environ par an. Pour les traiter, le cancérologue dispose de plusieurs armes qui sont la chirurgie, la radiothérapie, et l'utilisation d'agents antinéoplasiques.

Les agents antinéoplasiques peuvent être schématiquement divisés en deux classes:

- Les agents cytotoxiques responsables de mortalité cellulaire par des mécanismes très variés et souvent complexes.

- Les modificateurs du comportement biologique qui se subdivisent en modificateurs du phénotype cellulaire (hormones) et en modificateurs de la réponse de l'hôte (interleukines, interférons, TNF).

Dans la pratique actuelle, la grande majorité des agents anticancéreux utilisés fait partie des agents cytotoxiques. Plus de cinquante molécules sont utilisées dans le traitement des cancers humains et sont classées en fonction de leur mécanisme principal d'action en au moins cinq grandes familles (Alkylants, Intercalants, Agents scindants de l'ADN, Antimétabolites, Agents tubulo-affines).

2. PARTICULARITES DES TISSUS CANCEREUX.

Les agents anticancéreux doivent tuer aussi sélectivement que possible les cellules tumorales visées. Toutefois et malgré les progrès considérables réalisés dans la spécificité des molécules développées, ils restent incapables de respecter totalement les cellules normales. Il n'existe en effet pas un caractère unique distinguant une cellule cancéreuse d'une cellule normale, mais un ensemble de caractères phénotypiques et génotypiques.

2.1. LE GENOME DE LA CELLULE CANCEREUSE.

Le cariotype des cellules cancéreuses est généralement très anormal tant en ce qui concerne le nombre de chromosomes (fréquence de l'hyperploïdie) que leur structure, mais ces anomalies ne sont pas identiques dans toutes les cellules d'une même tumeur.

Cette instabilité génétique rend compte d'une plus grande sensibilité des cellules cancéreuses aux agents susceptibles de léser l'ADN.

2.2. CINÉTIQUE DES CELLULES ET TISSUS CANCÉREUX.

Comme chez la cellule normale, le cycle cellulaire se compose d'une période active et d'une période de repos (G0). La période active est divisée en 4 phases: G1, S, G2, M. Les anticancéreux sont dits "cycle-dépendants" lorsqu'ils sont actifs sur toutes les cellules à condition que celles-ci soient dans le cycle cellulaire actif: ils sont dits "phase-dépendants" lorsqu'ils n'agissent que sur une phase donnée du cycle cellulaire actif. Avant l'administration des médicaments "phase ou cycle dépendants", il est intéressant que le maximum de cellules se trouve dans le cycle cellulaire et ne soit donc plus en phase G0. Le terme utilisé est celui de recrutement; celui-ci est possible par réduction du volume tumoral grâce à un traitement chirurgical, radiothérapeutique, ou chimique. L'adriamycine par exemple est un cytotoxique cycle-dépendant actif sur les phases G1 et S (synthèse de l'ADN); elle est également capable de recruter les cellules en phase G0 pour les faire entrer en cycle actif. Les cellules en phase G1 (période post-mitotique) représentent, selon les cancers, 75 à 90% de toutes les cellules (CRAUSTE-MANCIET et coll, 1992).

La cinétique de la croissance tumorale n'est connue chez l'homme que pour les stades tardifs. Elle se ralentirait au fur et à mesure que le volume tumorale augmente à cause de l'agrandissement du compartiment de maturation et de la constitution de zones hypoxiques. Cette cinétique est définie par le temps de doublement qui varie chez l'homme de 7 jours à plusieurs années et est en moyenne de 2 à 6 mois. Les cellules d'une même tumeur n'ont pas toutes une cinétique identique (ESPIE et coll, 1992)

Les connaissances acquises sur les différentes caractéristiques des tissus tumoraux ont permis de synthétiser ou d'isoler des molécules dont la spécificité à l'égard des cellules tumorales est, sinon totale, notablement accrue. Ces connaissances ont aussi permis d'adapter, pour chaque tumeur, une stratégie chimiothérapeutique visant à optimiser l'efficacité du traitement ainsi qu'à en réduire la toxicité.

3. L'ADRIAMYCINE (DOXORUBICINE).

L'adriamycine (ADR) est un antibiotique antinéoplasique appartenant à la famille des anthracyclines, cette dernière étant classée parmi les cytotoxiques intercalants. Au sein des anthracyclines, l'ADR est la molécule dont le spectre d'activité est le plus large. C'est une molécule d'origine naturelle qui a été isolée en 1969 d'un champignon, *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (POWIS, 1987). Depuis son introduction en

thérapeutique au début des années 1970, on estime à plus de 2 millions le nombre de malades qui ont été traités par l'ADR.

3.1. INDICATIONS DE L'ADRIAMYCINE.

L'ADR, le plus souvent associée à d'autres anticancéreux, est couramment prescrite dans les services d'oncologie, que ce soit pour induire ou pour consolider une rémission d'un cancer. Les principales indications de l'ADR figurent dans le tableau 1.

Carcinomes du sein
Sarcomes des os et des parties molles
Maladie de Hodgkin
Lymphomes non hodgkiniens
Tumeurs solides de l'enfant
Cancers du poumon
Leucémies aiguës lymphoblastiques
Leucémies aiguës myéloblastiques
Cancer de la vessie
Cancer de l'estomac
Cancer de l'ovaire

Tableau 1: principales indications de l'ADR.

Des protocoles bien définis sont employés pour le traitement de ces tumeurs. Par exemple:

-C.A.P. (cyclophosphamide, adriamycine, cisplatine) employé dans les cancers ORL, des ovaires, de la vessie et le myélome.

-I.V.A. (ifosfamide, vépéside, adriamycine) utilisé dans le traitement des hépatomes et des sarcomes des parties molles.

-C.D.O.P. (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone) indiqué dans les lymphomes non hodgkiniens.

-F.A.C. (5-fluorouracile, adriamycine, cyclophosphamide) employé dans les cancers du sein.

3.2. POSOLOGIES DE L'ADRIAMYCINE.

Il existe plusieurs schémas d'administration de l'adriamycine. Le plus couramment utilisé est 30 à 60 mg/m² en bolus toutes les 3 semaines.

D'autres schémas ont été proposés dans le but de réduire la toxicité, notamment hématologique et cardiaque, de cette drogue:

-3 à 5 mg/m²/j en perfusion continue sur 3 à 21 jours (dose totale identique).

-10 à 15 mg/m² en administration hebdomadaire.

Quel que soit le schéma d'administration, la dose cumulée au cours des différentes cures de chimiothérapie ne doit pas dépasser 550 mg/m². Cette dose est réduite à 300 mg/m² en cas d'irradiation médiastinale incluant le coeur ou d'association à un anticancéreux cardiotoxique (actinomycine D, mitomycine, cyclophosphamide, vincristine, bléomycine).

3.3. PHARMACOCINETIQUE DE L'ADRIAMYCINE.

3.3.1. Voies d'administration.

L'ADR peut être administrée par voie veineuse (accès veineux central ou perfusion), par voie artérielle, ou par instillation intravésicale dans le traitement des cancers de la vessie.

3.3.2. Distribution.

Après administration intraveineuse, l'ADR est rapidement éliminée du plasma; la distribution tissulaire est importante. Elle est stockée dans les tissus, le rein, le coeur, l'intestin grêle, le foie, et les poumons, mais elle ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique.

La concentration plasmatique initiale après administration I.V. en bolus d'une dose de 30 à 60 mg/m² est de 2 à 6 µM. Lors de la phase d'équilibre avec les tissus (1 à 4 heures après injection), la concentration plasmatique est de 20 à 50 nM. La demi-vie d'élimination plasmatique est de 20 à 40 heures (CUMMINGS et coll, 1987).

Les tissus bien perfusés comme le coeur, le foie et les poumons atteignent très rapidement un état d'équilibre avec l'ADR plasmatique. Ainsi lors de l'administration d'ADR au rat, la concentration cardiaque atteint son maximum au bout d'une heure et décroît ensuite de 33% en 48 heures. Chez le chien, les concentrations cardiaques en ADR diminuent d'un facteur 70 en 20 jours (OLSON et coll, 1990). La demi-vie de l'ADR dans le coeur est approximativement de 1 à 3 jours chez l'animal.

L'ADR ne pénètre que faiblement dans les tumeurs solides. L'état d'équilibre avec l'ADR plasmatique est alors atteint en 1 à 3 heures.

3.3.3. Métabolisation.

L'ADR est en partie métabolisé; trois types de réactions métaboliques sont décrites:

-réduction du groupe cétonique en C13 (fig 4) par les aldo-réductases NADPH dépendantes présentes dans tout l'organisme mais préférentiellement dans le rein, le foie, et les poumons. Cette réaction permet la formation de doxorubicinol qui représente le métabolite principal et qui possède également une activité cytotoxique. La demi-vie plasmatique du doxorubicinol varie de 5 à 56 heures.

Dans le coeur de rat, le doxorubicinol apparaît dans les 24 heures qui suivent l'injection d'ADR. Les concentrations de doxorubicinol au niveau cardiaque sont 2 à 3 fois plus élevées que dans le foie en dépit de concentrations similaires en ADR une heure après injection dans ces deux tissus (OLSON et coll, 1990).

-hydrolyse ou réduction au niveau du C7 aboutissant à la formation d'aglycones. Le C7 déoxyaglycone est un produit du métabolisme radicalaire de l'ADR. Des taux circulants élevés peuvent être corrélés avec les phénomènes de toxicité cardiaque chez l'homme (CUMMINGS et coll, 1987).

-conjugaison sous forme de dérivés sulfonates et glucuronides, ces derniers ne représentant que 2% de la dose totale d'ADR administrée.

3.3.4. Elimination.

L'élimination de l'ADR sous forme inchangée ou métabolisé est réalisée majoritairement par le foie et le système biliaire; 40 à 50% de la dose totale administrée est éliminée par ce système en 5 à 7 jours. Le dosage de l'ADR dans la bile effectué après 7 jours révèle que l'ADR native y est le composé majoritaire (17% de la dose totale administrée) suivie par le doxorubicinol (9%). D'autres métabolites, dont la plupart n'ont pas été identifiés représente 15% de la dose totale administrée. 10% de la dose totale d'ADR est excrétée par les urines, en grande partie sous forme non métabolisée.

3.4. MODES D'ACTION DE L'ADRIAMYCINE.

Plusieurs mécanismes d'action sont décrits concernant ce produit: intercalation à l'ADN, inhibition de topoisomérase II, interaction avec les membranes cellulaires, et production de radicaux libres.

3.4.1. Interaction directe avec l'ADN: intercalation.

L'intercalation est le phénomène au cours duquel une molécule polycyclique plane se glisse entre les plateaux que constituent deux paires de bases contigües de l'ADN, entraînant un éloignement de ses paires de bases, une désspiralisation de l'ADN, et une accessibilité accrue du petit sillon de l'ADN (ESPIE et coll, 1992). Cette activité se produit sur les cellules en phase S ou en phase G1. Les liaisons drogue-ADN se créent spontanément, sont de forte affinité, mais restent réversibles. L'intercalation est responsable d'une inhibition de la replication et de la transcription de l'ADN. Dans les noyaux des cellules vivantes, plus de 99% de la doxorubicine est présente sous forme liée au DNA, indiquant ainsi que l'ADN est le site majeur de l'activité de la drogue (CUMMINGS et coll, 1991).

3.4.2. Interaction indirecte avec l'ADN: inhibition de la topoisomérase II.

La topoisomérase II est une enzyme capable d'effectuer une réparation conformationnelle de l'ADN après avoir créé des cassures des deux brins. L'inhibition de cette enzyme requiert une liaison de l'ADR à la protéine. L'ADR induit une stabilisation du complexe topoisomérase II-ADN dans lequel l'ADN est clivé sous forme de monobrins ou de double-brins. La formation d'un complexe ternaire médicament-enzyme-ADN serait un déterminant essentiel de l'activité de la drogue (ESPIE et coll, 1992).

3.4.3. Interaction avec les membranes cellulaires.

Les anthracyclines sont des molécules qui peuvent se lier avec une grande affinité aux membranes cellulaires, mais les sites de liaison n'ont pas tous été identifiés.

L'ADR peut former de solides complexes électrostatiques avec les phospholipides membranaires, en particulier la cardiolipine et la spectrine. La cardiolipine est un constituant mineur des membranes de la cellule normale. Par contre, dans les membranes des cellules tumorales, elle est présente à des taux beaucoup plus élevés et représente le phospholipide prédominant. La liaison de l'ADR à la cardiolipine pourrait causer des changements dans le fonctionnement et la structure de ces membranes, et contribuer ainsi à l'effet antitumoral de ce médicament. (GIANNI et coll, 1983).

3.4.4. Production de radicaux libres.

L'ADR, après activation par certaines flavoenzymes cellulaires ou par formation d'un complexe stable avec le fer, peut générer des espèces réactives oxygénées à l'origine de processus toxiques. Cette propriété sera développée dans le chapitre Adriamycine et radicaux libres.

3.5. EFFETS SECONDAIRES DE L'ADRIAMYCINE.

Les effets indésirables de l'ADR, leur importance, et leurs particularités sont présentés dans le tableau 2.

TOXICITE	IMPORTANCE*	PARTICULARITE
Hématologique -Leucopénie -Thrombopénie - Anémie	G2-G3	Dose dépendante, réversible, non cumulative. Commence 7 à 11 jours après la cure.
Locale -veinite	G2-G3	Cumulative, surtout en cas de perfusion continue.
Digestive -Nausée, vomissements -mucite -hémorragies digestives	G2	Dose-dépendante.
Alopécie	G3	
Cardiaque		Voir ci-dessous
Hypersensibilité	G1	

* G: grade de toxicité

Tableau 2 : effets indésirables de l'ADR.

Ces effets secondaires, mise à part la cardiotoxicité, sont communs à la quasi-totalité des anticancéreux. Ils traduisent l'absence de spécificité de ces médicaments sur le tissu tumoral et reflètent l'atteinte des tissus à renouvellement rapide.

La cardiotoxicité quand à elle peut être aigüe ou chronique.

-La toxicité aigüe survient dans les 48 heures suivant l'injection. Elle peut se caractériser par une tachycardie, des extrasystoles ou une insuffisance cardiaque. Ces troubles sont indépendants de la dose administrée et régressent le plus souvent sans séquelles.

-La toxicité chronique survient 1 à 3 mois après la dernière injection. Elle est corrélée à la dose totale administrée d'ADR et est cumulative entre les différentes anthracyclines.

Elle peut se caractériser par une réduction importante du voltage des complexes QRS rapides à l'ECG, une dilatation cardiaque apparaissant rapidement, et par la survenue précoce d'une insuffisance cardiaque résistante à la digitaline (cardiomyopathie).

Pour une dose cumulée d'ADR de 550mg/m^2 de surface corporelle, l'incidence de survenue d'une cardiomyopathie est de 3%, mais pour une dose cumulée de l'ordre de 600mg/m^2 , l'incidence atteint 30%. Des cardiotoxicités ont été également observées pour une dose cumulée de 200mg/m^2 (CUMMINGS et coll, 1987).

La cardiomyopathie faisant suite au traitement par les anthracyclines est de très mauvais pronostic, avec une mortalité de 48% (POWIS, 1989).

Histologiquement, l'atteinte cardiaque lors de la myocardiopathie peut se traduire par une vacuolisation des myocytes, un oedème interstitiel, une myocytolyse, une atrophie myocytaire, et une fibrose de substitution (GREEN et coll, 1984); Seule la biopsie myocardique permet d'évaluer le risque de toxicité cardiaque congestive chez les patients traités par l'ADR.

Chez l'enfant, l'administration d'ADR pourrait perturber sérieusement le développement du muscle cardiaque au cours de la croissance (DOROSHOW, 1991).

Les mécanismes biochimiques qui seraient impliqués dans la cardiotoxicité de l'ADR font l'objet d'un vaste débat. A l'heure actuelle, plusieurs hypothèses ont été émises, toutes pouvant contribuer à expliquer ce phénomène toxique.

-Tout d'abord, la production de radicaux libres oxygénés par l'ADR entraîne des altérations oxydatives des organelles des cellules myocardiques. Ce mécanisme sera développé dans le chapitre ADR et radicaux libres.

-L'ADR peut réagir, comme nous l'avons vu dans le chapitre "mode d'action de l'ADR", avec la cardiolipine. Ce phospholipide est présent en grande quantité dans la membrane interne des mitochondries. L'ADR forme avec lui un complexe électrostatique stable, ce qui inactive la chaîne de transport intramitochondriale d'électrons. En effet, certaines enzymes de la chaîne respiratoire (la cytochrome C oxydase, la cytochrome C réductase) ont besoin de cardiolipine non complexée pour maintenir leur activité (FRY et coll, 1981).

La formation de ces complexes peut également inhiber le transport du pyruvate à travers la membrane mitochondriale et perturber de ce fait le métabolisme énergétique de la mitochondrie (PARADIES et coll, 1988).

-La détérioration des canaux calciques lents par l'ADR peut également contribuer à la cardiotoxicité. L'ADR, en réagissant avec les lipides membranaires entourant ces canaux, favorise ainsi la survenue d'une surcharge intracytoplasmique en calcium. Cette



surcharge altère les cycles de contraction-relaxation du muscle cardiaque (FU et coll, 1990).

-Enfin, l'ADR peut être toxique par l'intermédiaire d'un de ses métabolites, le doxorubicinol. Ce dernier peut s'accumuler dans le tissu cardiaque. Il agit comme inhibiteur de certaines pompes ioniques du réticulum sarcoplasmique, des mitochondries, et de la membrane cytoplasmique. Ainsi, il altère la Ca-Mg-ATPase du réticulum, la Na⁺-K⁺ATPase et les échanges Na-Ca de la membrane cytoplasmique (OLSON et coll, 1990).

Dans le but de réduire la cardiotoxicité, certains auteurs ont proposé une modification du schéma posologique classique (bolus). A doses cumulées identiques, l'administration hebdomadaire de faibles doses d'ADR serait moins cardiotoxique qu'une administration unique à plus forte dose toutes les 3 semaines. De même, l'injection de faibles doses d'ADR par perfusion lente sur 96 heures, diminuerait d'un facteur 10 les concentrations plasmatiques de la drogue, réduisant notablement la cardiotoxicité et diminuant l'intensité des effets secondaires hématologiques et digestifs sans compromettre l'efficacité thérapeutique (ANDERS et coll, 1986; BRENNER et coll, 1984; CUMMINGS et coll, 1987). Cependant, la complication majeure de la perfusion lente est le développement d'une veinite, l'ADR étant un produit extrêmement vésicant.

3.6. RESISTANCE TUMORALE A L'ADRIAMYCINE.

3.6.1. Généralités sur la résistance tumorale.

Les tissus normaux ne développent jamais de résistance aux agents antitumoraux. Par contre, la transformation d'une cellule normale en cellule maligne peut s'accompagner d'une modification de sa sensibilité aux drogues se traduisant parfois par l'apparition de résistances.

Classiquement, on peut distinguer 2 types de résistances tumorales aux médicaments: une résistance liée aux conditions physiologiques et une résistance cellulaire intrinsèque.

La résistance liée aux conditions physiologiques fait référence à la notion de barrières physiologiques empêchant le médicament d'atteindre sa cible. Ces barrières peuvent être représentées par exemple par une diffusion limitée de la drogue dans la tumeur, ou encore une irrigation sanguine insuffisante (CHARCOSSET, 1991).

La résistance cellulaire intrinsèque correspond à un phénotype particulier exprimé par une cellule tumorale dans une population. Ce phénotype lui permet de résister à l'effet cytotoxique d'une ou plusieurs drogues antitumorales et est transmissible à sa descendance. Ces mécanismes biochimiques de résistance ont généralement une origine

génétique et surviennent soit par mutation, soit par modification de l'expression de protéines normales.

Les différents mécanismes de résistance cellulaire intrinsèque sont représentés dans le tableau 3.

Défaut de disponibilité du médicament dans la cellule cancéreuse par diminution de l'entrée ou par augmentation de l'efflux
Défaut d'activation du médicament lorsque celle-ci est requise pour l'activité.
Augmentation de la détoxification du médicament par des mécanismes spécifiques ou aspécifiques.
Altération quantitative ou qualitative de la cible ultime du médicament.
Réparation des lésions occasionnées par le médicament.

Tableau 3: Différents mécanismes de résistance intrinsèque de la cellule tumorale (d'après ROBERT, 1992).

3.6.2. Résistance tumorale aux anthracyclines.

Trois mécanismes principaux semblent intervenir dans ce type de résistance tumorale aux anthracyclines.

3.6.2.1. Augmentation de l'efflux cellulaire de la drogue: rôle de la glycoprotéine P.

Ce phénomène met en jeu une pompe membranaire active chassant hors de la cellule de nombreux médicaments hydrophobes de structure et de mécanismes d'action variés. Cette pompe appelée glycoprotéine P (Pgp), est le support moléculaire de la "multidrug résistance" (MDR). La résistance est alors croisée entre plusieurs classes d'anticancéreux, notamment entre les intercalants (anthracyclines, acridines, ellipticines), les poisons fusoriaux, et les inhibiteurs de topoisomérase II comme les épipodophyllotoxines. Chez l'homme, la Pgp est codée par le gène *mdr1* situé sur le chromosome 7. Elle est généralement surexprimée dans les cellules résistantes,

constituant alors la majorité des protéines transmembranaires. Dans les tissus humains normaux, la Pgp est retrouvée dans le foie, le rein, le colon, l'intestin grêle et le pancréas, exerçant peut-être une fonction de protection de ces organes. Le rôle isolé de la Pgp comme médiateur de la résistance multidrogue est néanmoins discutable puisque certaines tumeurs résistantes possédant le phénotype MDR n'expriment pas cette glycoprotéine (ROBERT, 1992).

3.6.2.2. Modification qualitative de la cible: Altérations des topoisomérases II.

Certaines altérations, spécifiques ou non, de cette cible communes à plusieurs médicaments anticancéreux ont pour résultat une résistance croisée des cellules à ces médicaments, résistance appelée "multidrug résistance atypique" (AT-MDR). Les drogues engendrant cette AT-MDR sont les intercalants (anthracyclines, acridines) et des agents non-intercalants comme les épipodophyllotoxines. Les lignées résistantes par ce mécanisme sont caractérisées par une diminution des cassures de l'ADN induites par la drogue ainsi qu'une diminution de l'activité topoisomérase II. L'identification des altérations moléculaires à l'origine des modifications phénotypiques de cette enzyme n'a pas encore été réalisée (ROBERT, 1992).

Les anthracyclines peuvent donc être à l'origine de plusieurs mécanismes de "multidrug resistance". Les conditions dans lesquelles l'un ou l'autre de ces mécanismes sera sélectionné sont encore obscures, mais il est devenu évident que la même lignée cellulaire peut exprimer simultanément plusieurs mécanismes distincts à des degrés variables. Les lignées purement MDR ou AT-MDR ne sont pas forcément les plus fréquentes et semblent correspondre aux premiers stades de résistance.

3.7.2.3. Augmentation des systèmes de défense antiradicalaires.

Les rôles joués par ces systèmes dans la résistance tumorale seront développés dans le chapitre Adriamycine et radicaux libres.

LES ESPECES REACTIVES
DE L'OXYGENE

LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

1. LA MOLECULE D'OXYGENE.

L'oxygène moléculaire (O₂) est l'élément vital par excellence. Mis à part quelques microorganismes et notamment les bactéries anaérobies, tous les animaux et les plantes nécessitent de l'oxygène pour produire leur énergie. La molécule est stable et peu réactive par elle-même. Cependant, dans certaines conditions métaboliques, elle peut être potentiellement nocive en donnant naissance à des espèces très réactives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO).

2. LES RADICAUX LIBRES OXYGENES.

On définit par radicaux libres tout atome, molécule, groupe d'atomes ou molécules possédant un électron non apparié sur son orbitale périphérique. L'électron célibataire confère aux radicaux une certaine instabilité ainsi qu'une grande réactivité. Les radicaux vont chercher à réappairier au plus vite leur électron. S'ils ne sont pas éliminés, ils vont réagir très rapidement avec des molécules environnantes, et par le fait être à l'origine de processus toxiques (EMERIT et coll, 1986). Cette toxicité, si elle est bénéfique par exemple dans la cadre de la défense antibactérienne, peut également être néfaste par destruction des membranes cellulaires, ainsi que par l'entretien de réactions inflammatoires.

3. LES DIFFERENTES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.

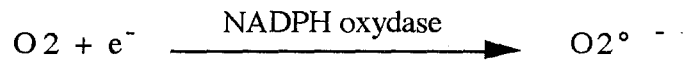
La génération de ERO implique l'activation de l'oxygène moléculaire soit par gain d'énergie (excitation), soit par gain d'électron (réduction).

3.1. L'OXYGENE SINGULET (¹O₂).

Il résulte essentiellement de l'activation photochimique de l'oxygène, ainsi que de la dismutation spontanée des anions superoxydes. Ce n'est pas un radical au sens strict mais il en possède le comportement. L'oxygène singulet est très instable et extrêmement réactif : sa durée de vie est de l'ordre de 2 μ s. Deux formes différentes selon leur niveau d'énergie sont décrites: Δ O₂ et Σ O₂.

3.2. L'ANION SUPEROXYDE (O₂^{•-}).

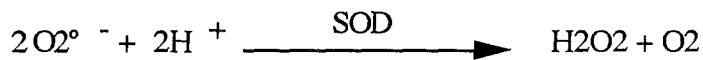
Il provient de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire.



C'est une molécule instable, relativement peu réactive.

3.3. LE PEROXYDE D'HYDROGENE (H₂O₂).

Il est formé par dismutation de deux anions superoxydes. La réaction est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD).



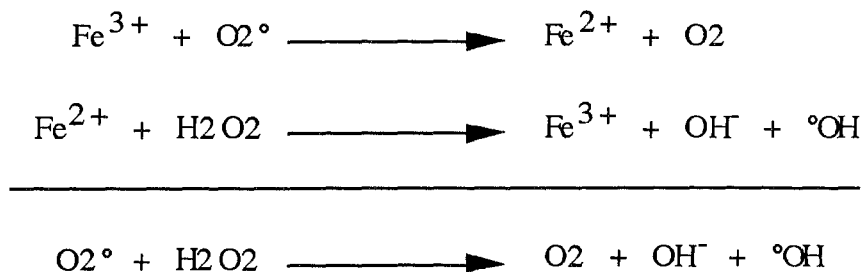
Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical puisqu'il ne possède pas d'électron non apparié. Cependant, c'est un puissant oxydant capable en présence d'ions ferreux de produire le radical hydroxyle °OH hautement toxique. Il fait donc partie des espèces réactives de l'oxygène.

3.4. LE RADICAL HYDROXYLE (°OH).

Il est formé par réduction de H₂O₂ par les métaux de transition et notamment le fer ferreux. Ce processus est appelé réaction de FENTON.



La réaction précédente fait partie du cycle d'HABER-WEISS. La réaction globale de ce cycle montre que l'interaction entre l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène donne naissance au radical hydroxyle.



$^{\circ}\text{OH}$ est une espèce extrêmement réactive et très toxique en biologie. Il a une demi-vie très courte de l'ordre de 10^{-6} secondes. C'est un oxydant puissant qui peut initier des réactions radicalaires en chaîne par interactions avec la plupart des molécules biologiques, notamment les lipides, les protéines, et les acides nucléiques.

3.5. LES RADICAUX PEROXYLES (ROO°) ET ALCOXYLES (RO°).

Ils sont générés par l'attaque d'un radical, le plus souvent $^{\circ}\text{OH}$, sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés. Bien que peu réactifs, ils sont à l'origine de réactions en chaîne dont la plus connue est la peroxydation lipidique. Leur demi-vie est de l'ordre de 10^{-3} secondes.

3.6. L'OZONE (O_3).

L'ozone n'est pas un radical puisqu'il ne possède pas d'électron non apparié. Bien que le mécanisme biochimique ne soit pas connu, cet élément pourrait donner naissance à l'anion superoxyde et au radical $^{\circ}\text{OH}$. Il serait impliqué dans des processus toxiques, notamment au niveau pulmonaire.

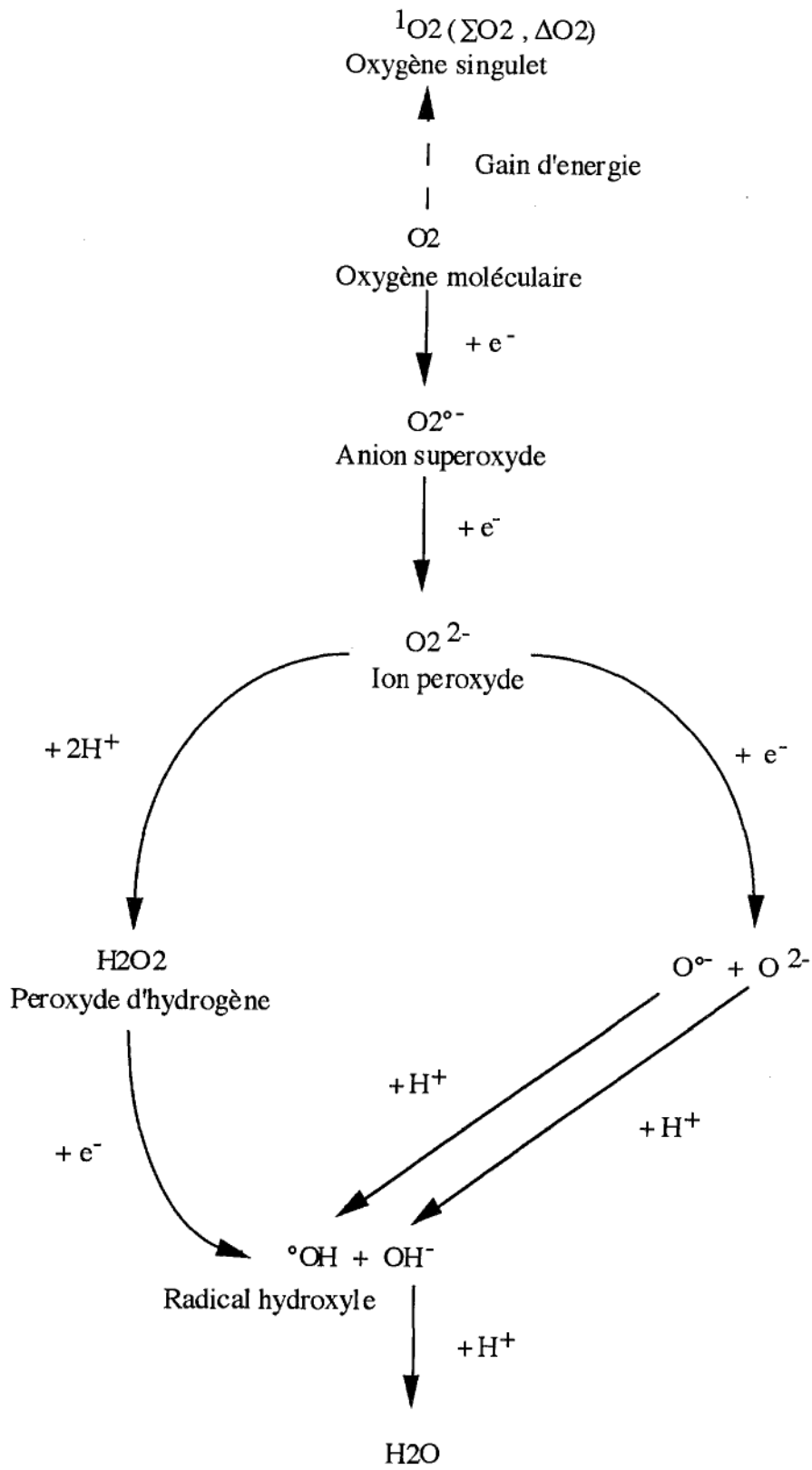


Figure 1: Les Espèces réactives de l'oxygène

4. DIFFERENTES SOURCES DE PRODUCTION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.

Les RLO résultent d'une réduction univalente ou divalente de l'oxygène moléculaire et sont produits en grande majorité par des réactions enzymatiques impliquées dans le maintien des fonctions de l'organisme. Parmi les enzymes les plus connues figurent la NADPH oxydase du polynucléaire neutrophile (GABIT et coll, 1979) et la cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire mitochondriale (FRIDOVICH, 1978). Cette dernière catalyse la réduction tétravalente de plus de 95% de l'oxygène consommé dans les cellules vivantes. Cependant, lors du métabolisme mitochondrial d'une cellule, 5% de l'oxygène suit une voie de réduction mono ou divalente. Des réactions non enzymatiques entre l'oxygène et certains composés organiques peuvent aussi générer des RLO.

Le tableau ci-dessous regroupe les différentes sources de radicaux oxygénés (tab 4).

REACTIONS D'AUTO-OXYDATION
Flavines (FADH ₂ , FMNH ₂) Quinones Hémoglobine Mélanine Tétrahydroptéridines
REACTIONS ENZYMATIQUES
Aldéhydes oxydases NADPH cytochrome P-450 réductase NADPH oxydase Xanthine oxydase Lipoxygénase tryptophane dioxygénase Ferrédoxine (P-430)
ORIGINE CELLULAIRE
Chaîne respiratoire mitochondriale et microsomale Leucocytes et macrophages lors de la phagocytose Aggrégation plaquettaire
FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX
Ultra-violets Ultrasons Radiations ionisantes Ions métalliques Médicaments

5. CIBLES ET DEGATS ENGENDRES PAR LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.

La production radicalaire est un phénomène physiologique. Elle se fait la plupart du temps sans conséquences pathologiques car elle est contrôlée par des systèmes de défense de nature enzymatique (SOD, Catalase, GPX) et non-enzymatique (Vitamines C, E, Caroténoïdes). Cependant, lorsque ces systèmes de protection sont dépassés (hyperproduction radicalaire) ou insuffisants (diminution des défenses radicalaires survenant par exemple au cours de pathologies chroniques), la neutralisation des radicaux libres va faire intervenir d'autres systèmes cellulaires tels que les protéines, les acides nucléiques, et les lipides membranaires. L'altération de ces différents systèmes sera alors à l'origine d'effets tissulaires toxiques.

5.1. ALTERATION DES PROTEINES (DAVIES et coll, 1987).

Elle est due essentiellement au radical hydroxyle ou à l'association $^{\circ}\text{OH}$, $\text{O}_2^{\circ-}$, O_2 . $^{\circ}\text{OH}$ attaque les chaînes peptidiques au niveau d'un carbone alpha conduisant à la formation d'intermédiaires radicalaires puis à un iminopeptide instable (fig 2). La protéine peut alors se cliver, s'aggréger par formation notamment de ponts bi-tyrosine. Ses structures primaires, secondaires ou tertiaires peuvent également être modifiées.

Les acides-aminés les plus sensibles aux ERO sont ceux possédant un cycle aromatique (tryptophane, tyrosine) ou un groupement sulfhydryle (cystéine, méthionine). De nombreuses enzymes cellulaires ainsi que des protéines de transport membranaire sont altérées lors de l'oxydation de leurs groupements thiols par les ERO.

Les protéines modifiées par oxydation sont enfin beaucoup plus sensibles à l'action de protéases spécifiques.

Les dénaturations protéiques d'origine radicalaire sont impliquées dans les pathologies comme la cataracte, la polyarthrite rhumatoïde et l'athérosclérose.

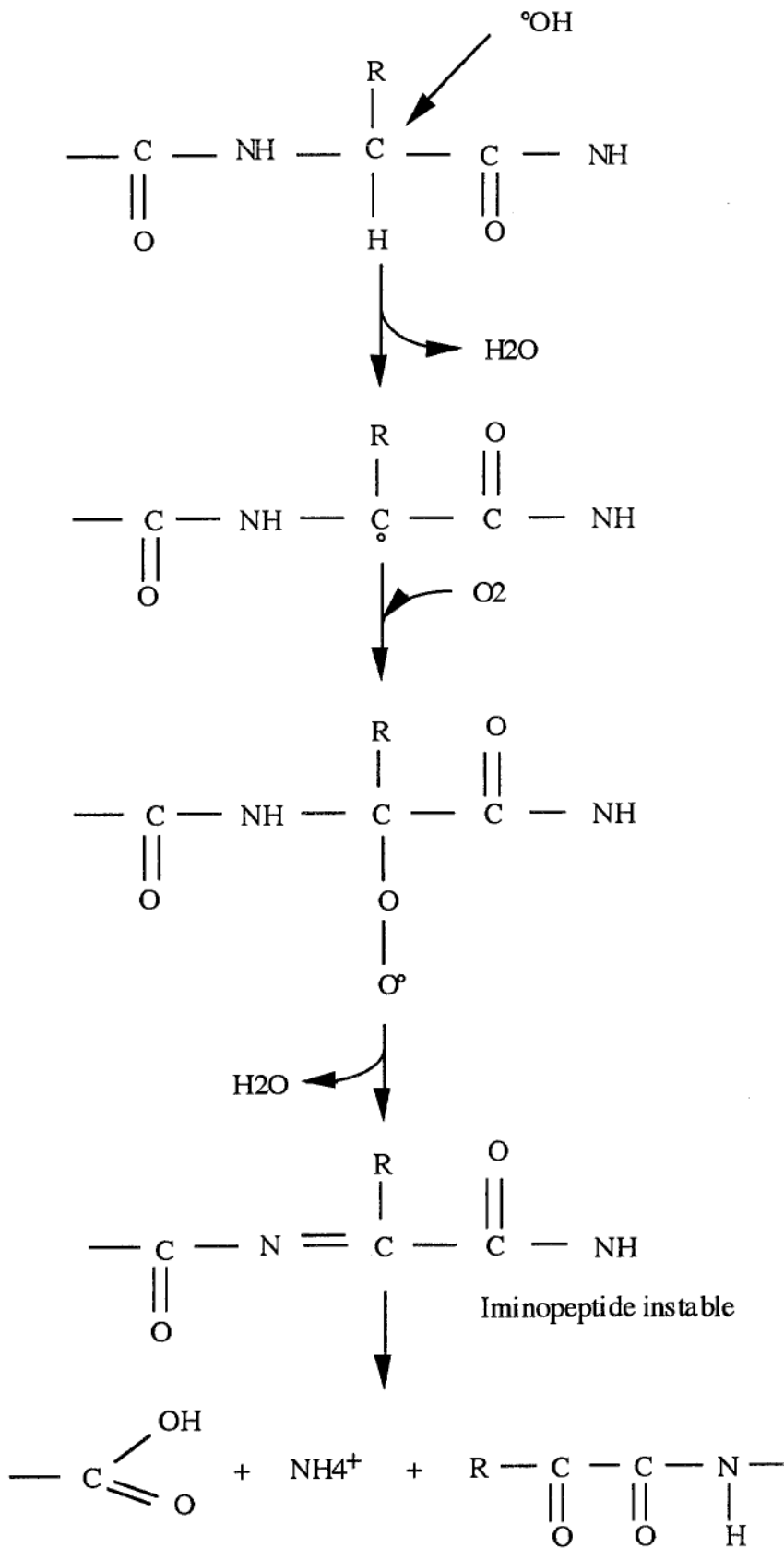


Figure 2 : attaque d'un peptide par le radical $^{\circ}\text{OH}$.

5.2. ALTERATION DES ACIDES NUCLEIQUES.

Les acides nucléiques sont très sensibles à l'attaque des RLO. L'attaque du radical $^{\circ}\text{OH}$ sur la molécule d'ADN va modifier les bases puriques et pyrimidiques, entraînant notamment la conversion de la thymine en 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine (thymine glycol) et l'hydroxylation de la guanine en 8-hydroxyguanine (CADET et coll, 1993). Ces modifications peuvent s'accompagner de mutations ponctuelles ou de ruptures de brins. Les dénaturations engendrées ont alors de graves conséquences sur la replication ainsi que sur la synthèse des protéines. Ce processus d'altération de l'ADN pourrait être impliqué dans la génèse de certains cancers.

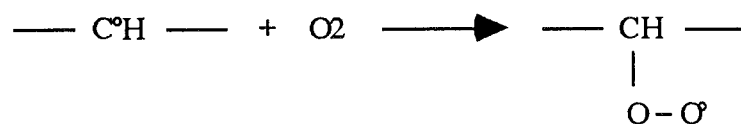
5.3. ALTERATION DES LIPIDES MEMBRANAIRES.

Les membranes cellulaires sont très riches en phospholipides basés sur différents modèles dont les plus connus sont les lécithines et les sphingomyélines. La peroxydation de ces phospholipides est définie comme la détérioration oxydative des acides gras polyinsaturés (AGPI) qui les composent. Les AGPI sont des molécules extrêmement sensibles aux attaques radicalaires; parmi ceux-ci, l'acide arachidonique, l'acide linoléique, et l'acide eicosapenténoïque sont particulièrement fragiles.

5.3.1. Le processus de peroxydation lipidique.

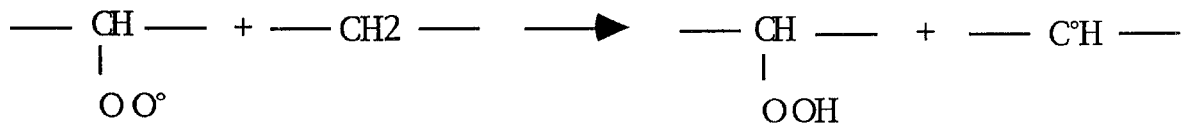
5.3.1.1. Initiation.

L'initiation de la peroxydation résulte de l'attaque d'une espèce radicalaire suffisamment réactive sur un groupement méthylène situé entre deux doubles liaisons de l'acide gras pour en arracher un atome d'hydrogène et former un radical carboné. Ce radical va se stabiliser par réarrangement moléculaire interne pour donner un diène conjugué qui peut réagir avec l'oxygène moléculaire et générer un radical peroxy.



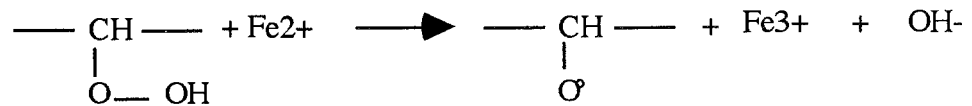
5.3.1.2. Propagation.

Le radical peroxy va, pour se stabiliser, arracher un atome d'hydrogène d'un acide gras voisin, aboutissant à la formation d'un hydroperoxyde et d'un nouveau radical carboné entretenant le processus de peroxydation.



Les hydroperoxydes sont instables, mais peu réactionnels. Ils peuvent cependant évoluer de différentes façons:

-En présence de fer (Fe^{2+}), ils sont convertis en radicaux alcoyles capables de relancer une nouvelle peroxydation.



-Dégradation en plusieurs produits et notamment en dialdéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal.

Le MDA est une molécule très toxique car elle a la capacité de se lier in vivo aux protéines, lipides, et acides nucléiques pour en modifier le comportement. Il entraîne alors une inactivation progressive de la cellule, voire une rupture membranaire (SIU et coll, 1982).

5.3.1.3 Terminaison.

La réaction en chaîne s'arrête lorsque deux radicaux libres appartenant ou non à la même molécule interagissent en créant des ponts entre eux. Elle est également freinée par la rencontre de molécules piègeuses de radicaux comme la vitamine E membranaire.

Les espèces réactives de l'oxygène

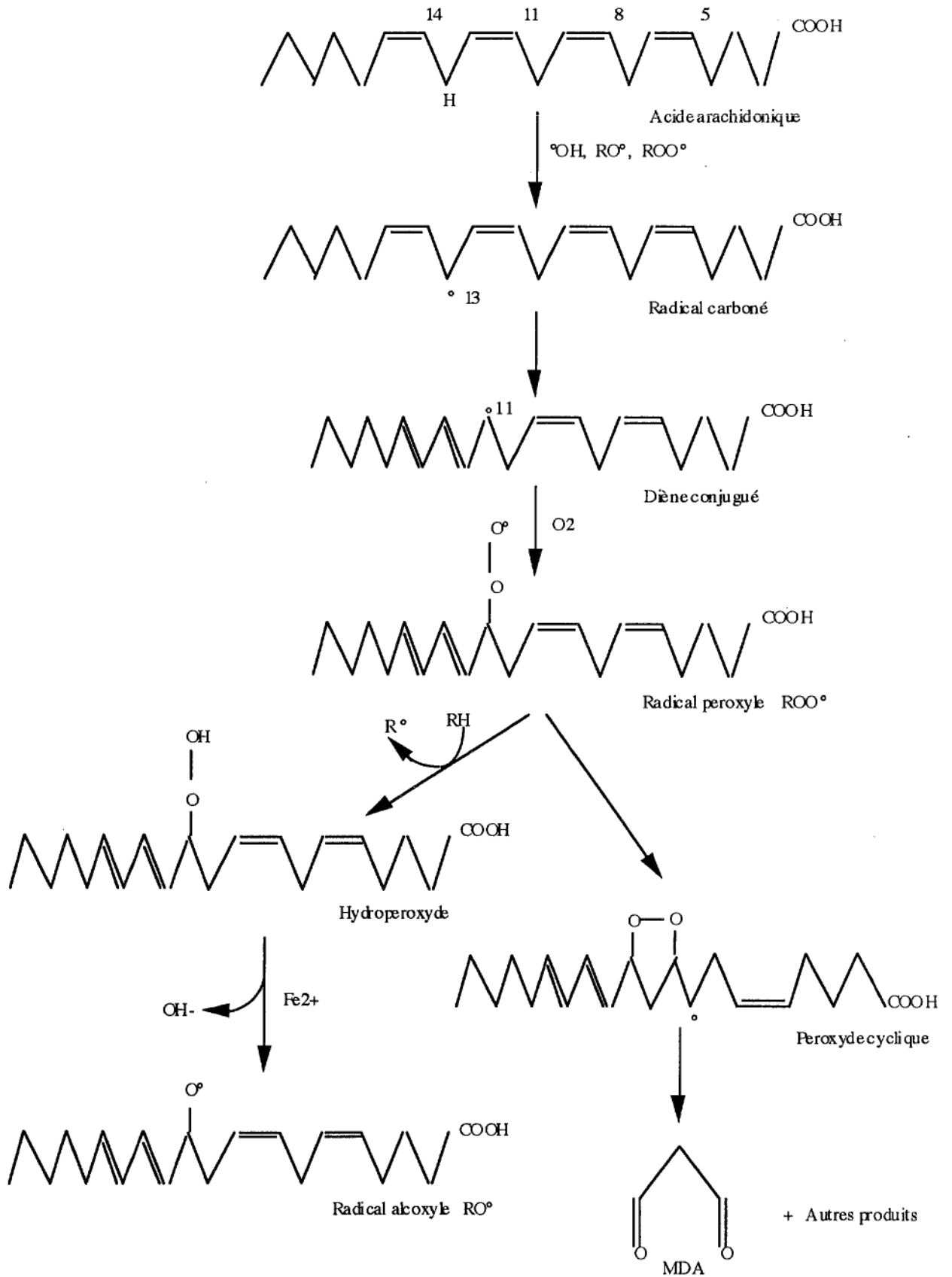


Figure 3: peroxydation de l'acide arachidonique (d'après HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1989).

5.3.2. Conséquences cellulaires de la peroxydation lipidique.

L'attaque radicalaire des acides gras insaturés et la lipoperoxydation qui en résulte sont à l'origine d'une désorganisation profonde de l'architecture membranaire: réarrangement des doubles-liaisons, pontages intra et inter-moléculaires. La membrane cellulaire perd ainsi sa fluidité et se fragilise avec des retentissements sur ses fonctions de perméabilité et de transfert de l'information.

Le tableau 5 résume les principales altérations cellulaires faisant suite à l'attaque radicalaire.

<p>ALTERATION DE LA BICOUCHE LIPIDIQUE</p>
<p>Diminution de la fluidité membranaire Augmentation de la charge négative de surface Apparition d'une conductivité pour les protons Perte de la stabilité électrique et accroissement non spécifique de perméabilité</p>
<p>MODIFICATIONS DES MEMBRANES ET DES ORGANITES CELLULAIRES</p>
<p>Inactivation des enzymes membranaires Oxydation des groupements thiols et accroissement de la perméabilité Découplage Oxydation-Phosphorylation Oedème et gonflement des mitochondries Inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale Perturbation du système d'hydroxylation hépatique Décharge d'enzymes lysosomiales Activation des phosphorylases membranaires</p>
<p>CHANGEMENTS DU METABOLISME ET DU COMPORTEMENT CELLULAIRE</p>
<p>Destruction des tocophérols, des thiols, et des stéroïdes Redistribution des ions intracellulaires Ralentissement de la division cellulaire</p>

Tableau 5 : Les Principales conséquences cellulaires des attaques radicalaires (d'après EMERIT et coll, 1986).

6. MECANISMES DE DETOXIFICATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.

Les ERO sont des espèces potentiellement réactives et dangereuses pour les tissus. Ces derniers sont donc équipés de différents systèmes de lutter contre les excès de production radicalaire afin de maintenir celle-ci à un niveau physiologique.

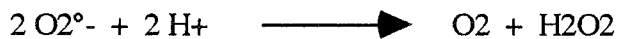
Les systèmes de protection peuvent être divisés en deux groupes: enzymatiques et non enzymatiques.

6.1. LES ENZYMES DE LA LUTTE ANTIRADICALAIRE.

6.1.1. Les enzymes de destruction des superoxydes ($O_2^{\circ-}$).

6.1.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD).

Ces métalloenzymes catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée suivant la réaction:



La vitesse spontanée de cette réaction est multipliée par 10^9 en présence de l'enzyme. Plusieurs formes de SOD ont été isolées et classées selon leurs localisations et/ou les métaux qu'elles contiennent (FRIDOVICH,1977).

-La Cu Zn SOD cytosolique est un dimère. Chaque sous-unité contient un atome de cuivre et un atome de zinc, ce dernier n'ayant pas de rôle catalytique mais une fonction stabilisatrice de l'enzyme.

-La Cu Zn SOD extracellulaire est un tétramère contenant aussi un atome de cuivre et un atome de zinc par sous-unité. Cette enzyme se présente sous trois formes A, B et C. La forme C est prépondérante et fixée fortement aux membranes des cellules endothéliales.

-La Mn SOD est selon les espèces un dimère ou un tétramère contenant généralement un atome de manganèse par sous-unité. Elle est localisée dans la matrice mitochondriale.

-La Fe SOD n'est présente que chez les bactéries et les plantes.

6.1.1.2. Autres enzymes.

-La thioredoxine réductase peut utiliser les superoxydes aussi bien que les peroxydes. Elle joue un rôle important au niveau de la peau où l'activité SOD est faible.

-L'indolamine 2-3 dioxygénase, présente dans le cytosol des kératinocytes.

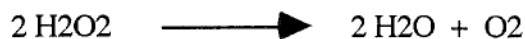
6.1.1.3. La céruléoplasmine.

La céruléoplasmine est une oxydase à cuivre qui contient 95% du cuivre circulant (GUTTERIDGE, 1984). C'est une protéine de la phase aigue de l'inflammation qui présente plusieurs activités biologiques: pour certains auteurs, elle possèderait un effet "SOD-like" avec cependant une moins grande efficacité que la SOD. Son activité ferroxidasique (oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+}) lui permet également de diminuer les réactions radicalaires secondaires à la présence de fer ferreux.

6.1.2. Les enzymes de destruction des peroxydes.

6.1.2.1. La catalase

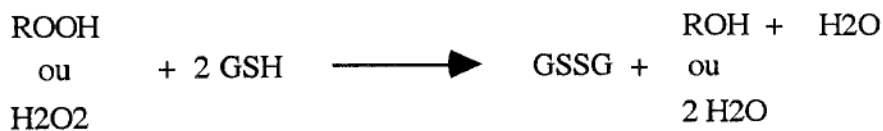
La catalase est un tétramère contenant un atome de Fe^{3+} par sous-unité. Elle assure la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau.



L'activité catalasique est localisée, chez l'animal, dans les péroxysomes.

6.1.2.2. Les glutathion peroxydases (GPX) (REDDY et coll, 1983).

-La GPX séléno-dépendante est un tétramère possédant un atome de sélénium solidement lié au site actif de chacune de ses 4 sous-unités. Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène ou des peroxydes organiques en présence de glutathion réduit.



Le maintien de son activité implique le recyclage du glutathion réduit par la glutathion réductase et la glucose-6-phosphatase deshydrogénase. Les globules rouges, le plasma, la rate, les poumons ne contiennent que la GPX séléno dépendante. Chez l'homme, cette enzyme est retrouvée en grande quantité dans le foie et les érythrocytes.

-La Phospholipide GPX, monomérique ou tétramérique est présente dans le cytosol des cellules humaines mais n'exerce son activité uniquement dans la membrane pour réduire les phospholipides oxydés (URSINI et coll, 1985).

6.1.2.3. Les glutathion S-transférases.

Ces enzymes catalysent des réactions de détoxification de composés électrophiles (drogues, xénobiotiques....) en liant ceux-ci de façon covalente au glutathion réduit.



Elles ont également une activité peroxydasique envers les hydroperoxydes, mais ne métabolisent pas le peroxyde d'hydrogène.

6.2. LES SYSTEMES DE DEFENSE NON ENZYMATIQUES.

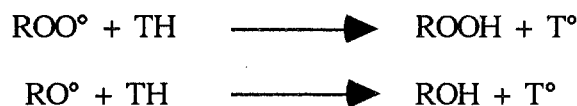
Ils regroupent les molécules capables de fixer ou dégrader les radicaux libres en étant elles-mêmes modifiées ou détruites. Parmi ces antioxydants on distingue les scavengers neutralisant plutôt le radical °OH et les atténuateurs piégeant plutôt l'oxygène singulet.

6.2.1. Les vitamines liposolubles.

6.2.1.1. La vitamine E ou alpha tocophérol.

Quatre tocophérols sont connus, l'alpha tocophérol étant biologiquement le plus connu et son nom classiquement confondu à celui de la vit E.

Elle siège de façon prépondérante dans les membranes cellulaires. Son activité antioxydante majeure consiste à réagir avec les radicaux peroxydes et alcoxydes de la chaîne de peroxydation (DEL MAESTRO et coll, 1980). La susceptibilité des lipides membranaires à la peroxydation est directement liée à la concentration en vitamine E de la membrane.



Le radical tocophéryl (T°) formé est relativement stable et interrompt l'étape de propagation radicalaire.

6.1.2.2. Les caroténoïdes (KRINSKY, 1988).

Ils combattent l'effet toxique de l'oxygène singulet au niveau des tissus exposés à une photoagression. Ce sont aussi des piègeurs de radicaux peroxydes. Localement, ils protègent la rétine riche en acides gras polyinsaturés contre la lipoperoxydation.

6.1.2.3. La vitamine A et l'acide rétinolique (SAMOKYSIN et coll, 1990; VILE et coll, 1988a).

Ils agissent tous les deux en tant que scavengers de l'oxygène singulet et des radicaux peroxy.

6.2.2. Les vitamines hydrosolubles et autres scavengers.

6.2.2.1 L'acide ascorbique ou vitamine C (HALLIWELL et coll, 1976).

Son activité antioxydante relève de deux mécanismes:

-piègement des radicaux $O_2^{\circ-}$, $^{\circ}OH$ et peroxy.

-Régénération de la vitamine E oxydée (tocophéryl) en vit E native.

Pour certains auteurs, ses propriétés antioxydantes ne s'expriment qu'à forte concentration; à faible concentration comme au niveau plasmatique, elle pourrait plutôt jouer le rôle d'oxydant. De plus, en présence de cuivre ou de fer, elle peut former un puissant système prooxydant générateur d' $^{\circ}OH$ et d' H_2O_2 .

6.2.2.2. Le glutathion réduit (KLAASEN et coll, 1969).

Le glutathion réduit est le cofacteur de nombreuses enzymes antioxydantes. Il a aussi un effet protecteur direct en piégeant les radicaux par des réactions non enzymatiques: c'est un puissant détoxifiant de xénobiotiques.

6.2.2.3. Les métallothionéines (FAVIER, 1992).

Ce sont de petites protéines très riches en cystéine (50% des acides-aminés de la molécule) présentes dans le cytosol de la cellule. Leur action antioxydante peut être directe ou indirecte:

-directe par l'intermédiaire des groupements thiols piègeurs des radicaux comme $^{\circ}OH$ et $O_2^{\circ-}$.

-indirecte par leurs propriétés chélatrices de métaux catalyseurs de réaction de FENTON.

Leur synthèse est induite par l'administration de zinc ainsi que par les radiations UV et l'alcool.

6.2.2.4. Autres molécules (FAVIER, 1992).

Des molécules comme le glucose, la créatinine, l'acide urique sont considérées physiologiquement comme antioxydantes. Cependant, elles ne possèdent pas la puissance des systèmes décrits auparavant et par conséquent ne jouent qu'un rôle mineur dans la

protection contre les radicaux libres.

Parmi les oligoéléments, le zinc aurait une importance capitale dans la défense antiradicalaire: il serait impliqué dans plusieurs processus charnières de lutte antiradicalaire.

- cofacteur de la CU ZN SOD (stabilisateur de l'enzyme).
- inducteur de synthèse des métallothionéines.
- protecteur des groupements thiols contre les dommages catalysés par le fer.
- inhibiteur de réaction de FENTON catalysée par le fer.
- protecteur des membranes cellulaires.

Les principaux antioxydants biologiques et leurs localisations sont résumés dans le tableau 6.

RADICAUX	SYSTEMES ANTIOXYDANTS	LOCALISATIONS
O₂^{°-} Superoxyde	Cu Zn SOD Mn SOD Ascorbate Glutathion réduit	Cytosol Mitochondrie Ubiquitaire Ubiquitaire
H₂O₂ Peroxyde d'hydrogène	Catalase GPX séléno dépendante Glutathion réduit	Peroxisomes Mitochondrie, cytosol Ubiquitaire
°OH Hydroxyle	Formate Acides gras insaturés Vitamine E Sucres	Ubiquitaire Membranes Membranes Ubiquitaire
¹O₂ Oxygène singulet	Beta carotène Acides gras insaturés Glutathion réduit Vitamine E Acides aminés H ₂ O	Membranes Membranes Ubiquitaire Membranes Cytosol Ubiquitaire

Tableau 6 : Principaux systèmes antioxydants biologiques et leurs localisations

ADRIAMYCINE ET
RADICAUX LIBRES

ADRIAMYCINE ET RADICAUX LIBRES.

L'activité biologique et la toxicité d'un grand nombre de drogues antitumorales peuvent être liées à des réactions d'oxydo-réduction et à la production d'espèces réactives de l'oxygène. Parmi ces drogues, l'adriamycine, du fait de son formidable potentiel antitumoral, est celle dont le mécanisme d'action radicalaire a suscité le plus d'intérêt.

1. LES MECANISMES DE PRODUCTION RADICALAIRE.

La production de radicaux libres par l'ADR est étroitement liée à la structure chimique de cette molécule.

1.1. STRUCTURE DE L'ADRIAMYCINE.

La structure de l'ADR comprend deux parties distinctes:

- un tétracycle aglycone quinonique dérivé du naphtacène et insoluble dans l'eau.
- un sucre aminé, la daunosamine, hydrosoluble, fixé sur le carbone 7 de l'aglycone.

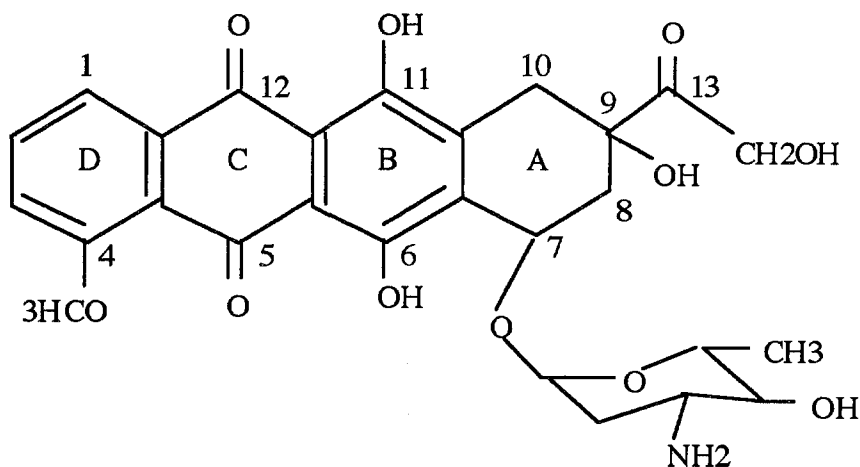


Figure 4: structure de l'adriamycine.

Plusieurs parties de la molécule peuvent jouer un rôle dans les phénomènes radicalaires:

- le cycle C est une quinone susceptible de générer un radical semiquinone après réduction chimique ou enzymatique à un électron.
- le cycle B est une hydroquinone activable en radical semiquinone après oxydation à un électron.

-les atomes d'oxygène en C11 et C12 représentent probablement le site de chélation du fer.

1.2. LE CYCLE D'OXYDO-REDUCTION DE L'ADRIAMYCINE.

GOODMAN et HOCHSTEIN (1977) sont les premiers à observer, sur un modèle microsomal, que la cytochrome P-450 réductase, en présence d'ADR et de NADPH, consomme de l'oxygène. Sur un modèle identique, SATO et coll (1977) mettent en évidence par résonance paramagnétique électronique un signal correspondant au radical semiquinone et aux radicaux oxygénés. La conjonction de ces deux expériences permet alors de définir le cycle d'oxydo-réduction de l'ADR.

La réduction monoélectronique, de nature enzymatique ou chimique, de l'ADR aboutit à la formation d'un intermédiaire instable, le radical semiquinone (ADR-SQ) . Ce radical réagit alors rapidement avec l'oxygène moléculaire pour redonner l'ADR initiale et générer l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) qui est le premier maillon de la chaîne radicalaire (voir figure 5). Ce cycle peut fonctionner tant que de l'oxygène moléculaire reste disponible pour l'alimenter.

1.2.1. Les enzymes du cycle d'oxydo-réduction.

Les enzymes catalysant la réduction monoélectronique de l'ADR ne sont pas spécifiques à ce médicament. Ce sont les flavoenzymes réparties à tous les niveaux de la cellule (POWIS, 1989). Parmi les plus importantes figurent :

- La NADPH cytochrome P-450 réductase présente dans les réticulums endoplasmiques et sarcoplasmiques cellulaires.
- La NADH déhydrogénase mitochondriale.
- La xanthine-oxydase présente dans le cytoplasme cellulaire.

1.2.2. Espèces radicalaires produites lors du cycle d'oxydo-réduction de l'ADR.

La pression partielle en oxygène ambiant est un facteur déterminant conditionnant la nature des espèces radicalaires produites par l'oxydo-réduction de l'ADR. A partir de l'ADR-SQ, plusieurs voies sont donc possibles:

- En aérobiose, la production de l'anion superoxyde est privilégiée. Celui-ci peut, par des mécanismes type FENTON et HABER-WEISS, donner naissance au radical hydroxyle impliqué dans différents effets biologiques comme la peroxydation lipidique, la peroxydation protéique, et les cassures de l'ADN.

-En anaérobiose ou à de faibles pressions partielles en oxygène, deux réactions sont décrites:

Une réaction directe entre l'ADR-SQ et le peroxyde d'hydrogène en présence de concentrations catalytiques de fer génère le radical hydroxyle ou une espèce "°OH like" mimant son activité et appelée crypto-hydroxyl radical. Ce mécanisme aurait un rôle important dans l'activité antitumorale de l'ADR lorsque des conditions physiologiques similaires sont rencontrées (WINTERBOURN et coll, 1985).

L'ADR-SQ, instable, perd son groupement daunosamine et se transforme en un nouveau radical, le radical C7. Ce dernier peut se lier de façon covalente aux macromolécules cellulaires ou devenir, après réduction, un produit relativement stable, le C7-déoxyaglycone. Une forme tautomère du C7-déoxyaglycone, le C7-quinone méthide serait un produit potentiellement toxique pour les cellules tumorales (SINHA et coll, 1984).

Le cycle d'oxydo-réduction de l'ADR et les différentes espèces produites sont représentés dans la figure 5.

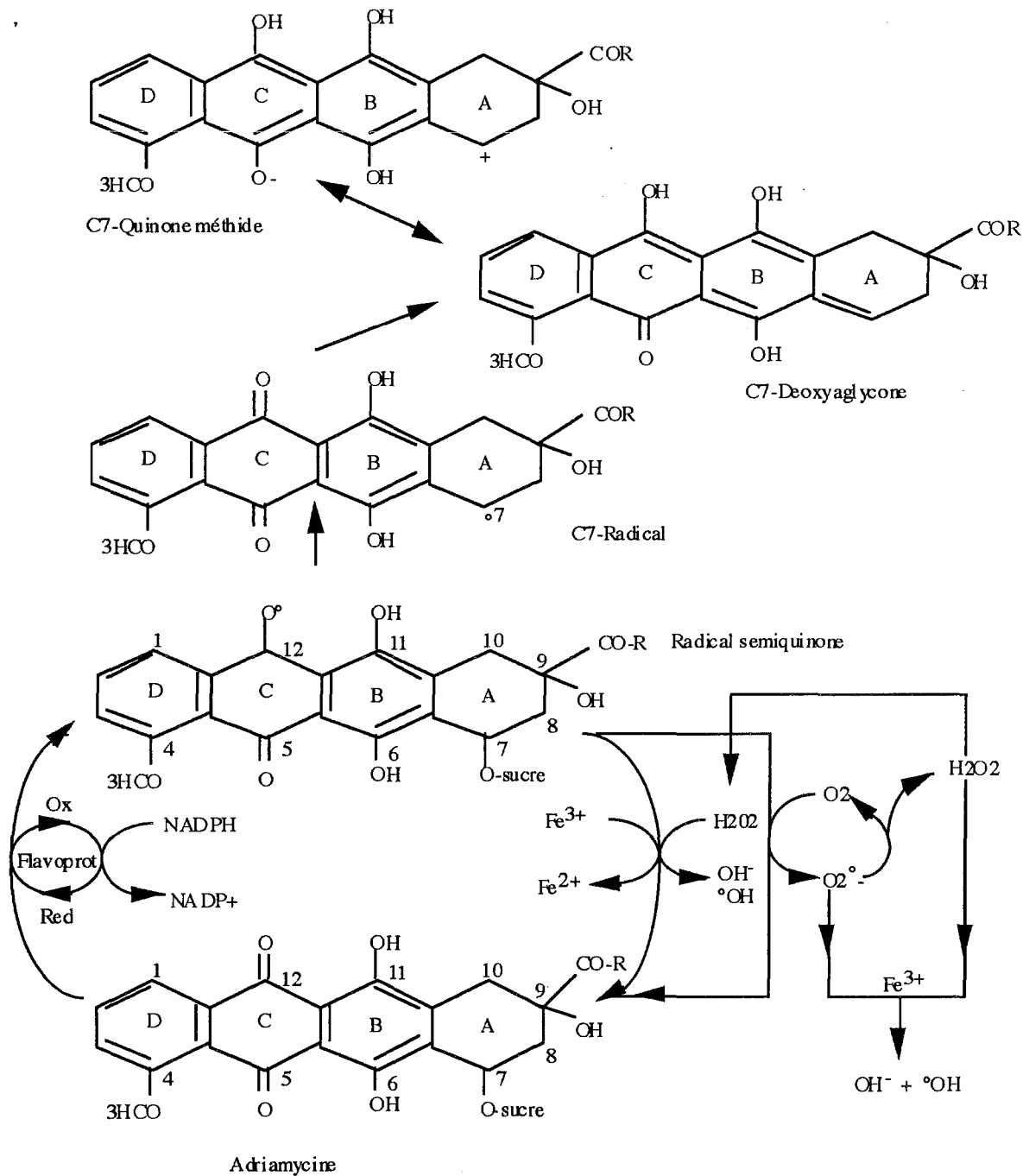


Figure 5: cycle red-ox de l'ADR (d'après SINHA et coll, 1984).

1.3. ADRIAMYCINE ET COMPLEXES METALLIQUES.

Une des propriétés des anthracyclines et donc de l'ADR est leur capacité à former de très solides complexes avec le fer ainsi qu'avec d'autres ions métalliques. Ces complexes pourraient être la forme active de la drogue in vivo (POWIS, 1989).

1.3.1. Les complexes ferriques.

L'ADR forme un complexe avec le fer ferrique Fe^{3+} dans lequel trois molécules d'ADR sont liées à une molécule de fer; la constante de stabilité de ce complexe, aux environs de 10^{30} , est l'une des plus élevée pour un complexe ferrique.

1.3.1.1. Sources de fer.

Les concentrations en fer libre sont très basses dans l'organisme. La formation des complexes ferriques impose donc l'accessibilité de l'ADR aux différents sites de stockage du fer. DEMANT et coll (1986) ont montré que le fer lié à la transferrine était accessible à l'ADR. Cette dernière est aussi capable d'extraire le fer Fe^{3+} de la ferritine, forme majeure de stockage du fer dans la cellule. Cette réaction est facilitée par la réduction du fer (III) en fer (II) par l'ADR-semiquinone ou l'anion superoxyde (MONTEIRO et coll, 1988).

1.3.1.2. Production radicalaire par le complexe fer-ADR.

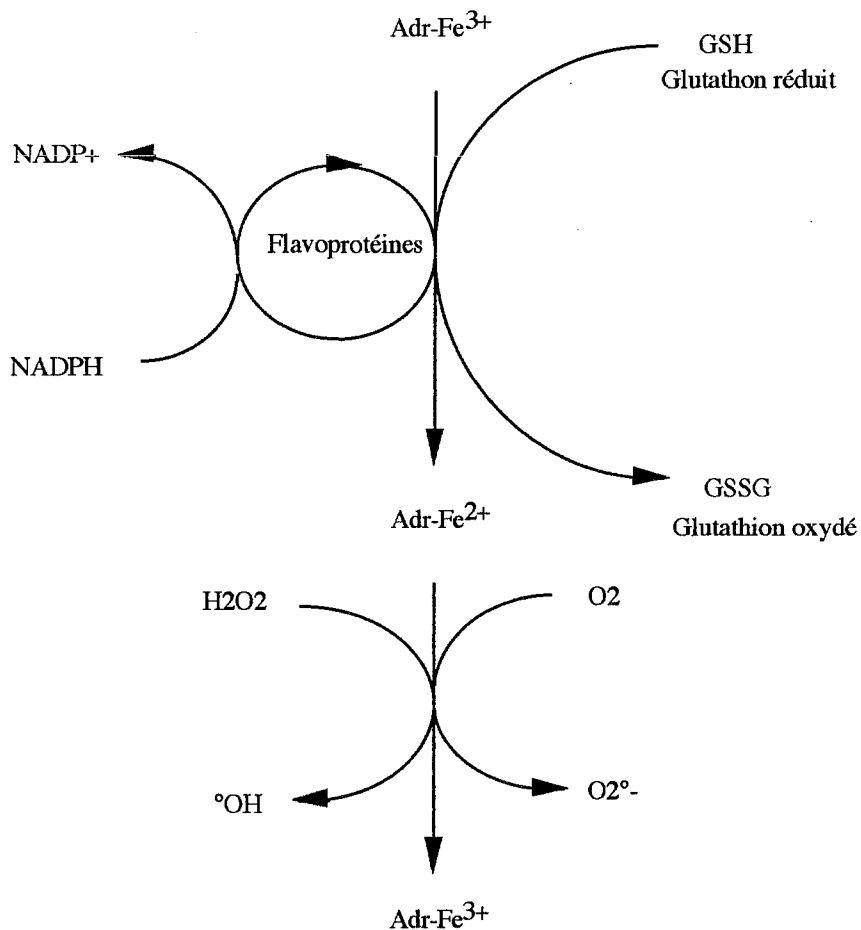
Deux mécanismes distincts permettent la génération de radicaux libres oxygénés:

- le premier nécessite la présence d'un système réducteur exogène au complexe.
- le second dépend d'un transfert intramoléculaire d'électron (KEIZER, 1990).

En présence d'un système réducteur exogène au complexe.

Le complexe ADR- Fe^{3+} est réduit en ADR- Fe^{2+} aussi bien enzymatiquement par la NADPH cytochrome P-450 réductase que par les molécules à groupements thiols comme la cystéine et le glutathion. Lors de cette réduction, aucun métabolite de l'ADR n'est formé. Le complexe ADR- Fe^{2+} peut réagir avec l'oxygène moléculaire ou le peroxyde d'hydrogène pour former respectivement l'anion superoxyde et le radical hydroxyle. En présence d'une quantité suffisante de glutathion réduit, ce cycle d'oxydo-réduction peut fonctionner indéfiniment. In vitro, la production de radicaux est inhibée par le 4-7 diphenyl 1-10 phénantroline sulfonate, un chélateur spécifique du fer Fe^{2+} , indiquant que ce dernier est formé pendant la réaction.

La réduction du complexe ADR- Fe^{3+} et les espèces radicalaires produites sont représentées dans la figure 6.

Figure 6: réduction du complexe ADR-Fe³⁺

Transfert intramoléculaire d'électron.

Le complexe ADR-Fe³⁺ peut réduire le fer chélaté par un transfert intramoléculaire d'électron, soit par oxydation du cycle hydroquinonique aboutissant à la formation d'un radical semiquinone oxydé, soit par oxydation de la chaîne latérale en C9. Les oxydations successives de la chaîne latérale aboutiront à terme à la formation d'un métabolite oxydé de l'ADR appelé 9-COOH-doxorubicine. Les radicaux oxygénés produits lors de cette réaction sont le superoxyde et le radical hydroxyle.

Le mécanisme de cette réaction est schématisé dans la figure 7.

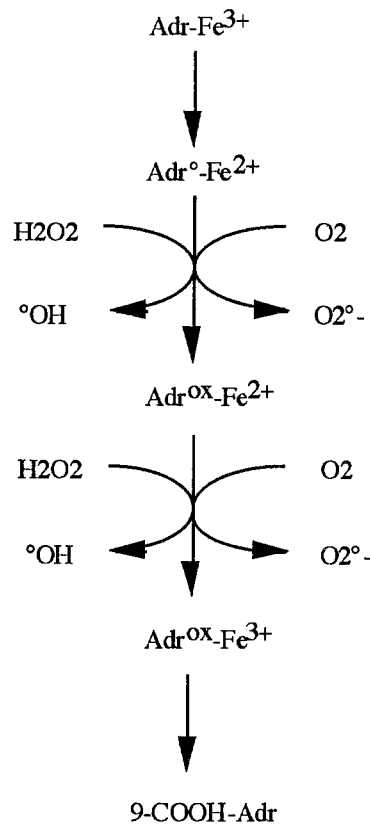


Figure 7: autoréduction du complexe ADR-Fe³⁺

Au sein du complexe, le fer joue donc un rôle capital puisque sa réduction permet la génération d'espèces radicalaires oxygénées toxiques.

L'aptitude de l'ADR à former des complexes avec le fer peut également affecter la croissance cellulaire en complexant le fer nécessaire au métabolisme cellulaire. Les besoins en fer pour une division rapide des cellules, telles que les cellules cancéreuses, les cellules de la muqueuse intestinale et de la peau sont très importants. Par conséquent, ces tissus seront les plus affectés par la déplétion en fer provoquée par l'ADR.

1.3.2. Autres complexes métalliques.

L'ADR est capable de former un complexe avec la plupart des métaux de transition, mais le complexe avec le cuivre est celui qui a suscité le plus grand intérêt. L'ADR forme avec le cuivre Cu²⁺ un complexe de coefficient stochiométrique 1/1 et de constante de stabilité de 10¹⁸. Ce chélate a la capacité, comme celui du fer, de réduire l'oxygène moléculaire en anion superoxyde. Cependant, en présence de glutathion réduit, le complexe cuivrique est instable et se dissocie, libérant alors de l'ADR libre (HASINOFF et coll, 1988). Certains auteurs ont suggéré que le complexe ADR-Cu²⁺

pourrait être la forme physiologique de la drogue dans le sang, argumentant sur la relative abondance de cuivre par rapport au fer dans la circulation.

2. ROLE DES RADICAUX LIBRES DANS L'ACTIVITE ANTITUMORALE DE L'ADRIAMYCINE.

Les mécanismes radicalaires de cytotoxicité de l'ADR ont suscité, jusqu'à ce jour, un grand nombre de travaux. Cependant, une question reste toujours d'actualité: les radicaux libres issus du métabolisme de l'ADR jouent ils un rôle à part entière dans l'activité antitumorale de cette molécule, ou ne représentent t'ils qu'un des effets secondaires gênants accompagnant l'utilisation de ce produit.

L'intercalation et l'inhibition de la topoisomérase II constituent des mécanismes privilégiés d'altération de l'ADN par l'ADR. Cependant, de nombreux auteurs ont démontré que les radicaux libres oxygénés ainsi que certaines molécules radicalaires issues du cycle d'oxydo-réduction de l'ADR pouvaient avoir une action toxique sur l'ADN.

2.1. Alkylation de l'ADN par les produits de réduction de l'ADR.

Un agent alkylant est capable de remplacer un proton d'une molécule par un groupement alkyle. La liaison des alkylants à l'ADN est irréversible et ne peut être séparée qu'après excision.

-En aérobiose, la réduction chimique ou enzymatique de l'ADR aboutit à la formation du radical semiquinone. Ce radical peut se comporter in vitro comme un agent alkylant de l'ADN. L'importance de cette réaction est néanmoins limitée par le fait que l'ADR-SQ est instable: sa demi-vie en milieu aérobie est inférieure à 0,1 millisecondes. Dès que ce radical est formé, il réagit très rapidement avec l'oxygène moléculaire, favorisant ainsi la formation du superoxyde au dépend de la réaction d'alkylation (KEIZER et coll, 1990).

-En anaérobiose, un intermédiaire dans la formation du C7-déoxyglycone, le C7-radical est décrit par certains auteurs comme un alkylant potentiel de l'ADN. Cette qualité est malgré tout contestée par d'autres auteurs qui évoquent une réactivité insuffisante du C7-radical pour lui permettre d'engendrer ce type d'altération de l'ADN (ABDELLA et coll, 1985).

La nature chimique exacte des résidus de réduction de l'ADR capables d'alkyler l'ADN n'a pas été clairement élucidée (BARTOSZEK et coll, 1992). Cependant, ces dérivés

existent et se lient à l'ADN avec un rapport de un adduit pour 12 à 15 nucléotides. Les régions de l'ADN contenant de la guanine et de la cytosine seraient des sites préférentiels d'alkylation (POWIS, 1989).

2.2. Dégradation de l'ADN par les espèces réactives de l'oxygène issus du cycle d'oxydo-réduction de l'ADR.

L'intercalation de l'ADR à l'intérieur de la double hélice d'ADN inhibe sa réduction enzymatique, empêchant donc la formation in situ d'espèces radicalaires. Parallèlement, les radicaux oxygénés provenant de la réduction cytoplasmique de l'ADR ne sont pas assez stables pour diffuser dans le noyau. Pour avoir une action délétère sur l'ADN, les radicaux doivent obligatoirement être produits dans le noyau ou à proximité immédiate de celui-ci. De récents travaux ont montré que ce phénomène est possible: des noyaux isolés incubés avec du NADPH ont activé l'ADR en ADR-SQ détectée par résonance paramagnétique électronique; ce radical, en présence d'oxygène, a donné naissance au superoxyde et au radical hydroxyle (POWIS, 1989).

Le radical hydroxyle est très toxique sur l'ADN puisqu'il provoque des mutations ponctuelles ainsi que des cassures des brins de la double hélice (AKMAN et Coll, 1992).

2.3. Lésions de l'ADN induites par le complexe fer-ADR.

Le complexe ADR-Fer se lie fortement à l'ADN pour former un complexe ternaire ADR-Fer-ADN très stable et difficilement séparable (ELIOT et coll, 1984). Contrairement à l'ADR intercalée, le complexe ternaire préserve ses capacités de réduction de l'oxygène moléculaire par un mécanisme thiol-dépendant. Ce complexe ternaire est également beaucoup plus efficace que le complexe libre pour catalyser la transformation du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle (MUINDI et coll, 1984)fig. 6). En effet, l'addition d'ADN à un milieu réactionnel contenant le complexe ADR-fer et le peroxyde d'hydrogène stimule la formation du radical °OH de plus de 250% (POWIS, 1989).

Cette production radicalaire, en contact étroit avec la double hélice, a pour conséquence un intense clivage de l'ADN. La catalase, les chélateurs du fer, et les scavengers du radical °OH sont de bons protecteurs dans ce système.

L'ADR, après réduction enzymatique ou par le biais du complexe avec le fer, donne naissance à des espèces alkylantes et à des ERO capables d'endommager l'ADN cellulaire. La cytotoxicité de l'ADR ne se limite cependant pas à son activité sur l'ADN

cellulaire. D'autres constituants de la cellule tumorale sont susceptibles d'être également altérés, comme par exemple les mitochondries et le réticulum endoplasmique.

3. ROLE DES RADICAUX LIBRES DANS LA CARDIOTOXICITE DE L'ADRIAMYCINE.

La cardiotoxicité de l'ADR, comme nous l'avons vu dans le chapitre "Adriamycine" peut être rattachée à la production de radicaux oxygénés par cette molécule et aux phénomènes peroxydatifs qui en découlent.

Dans les cellules myocardiques, le métabolisme oxydatif de l'ADR se déroule au niveau de deux sites principaux: le réticulum sarcoplasmique contenant la NADPH cytochrome P450 réductase et les mitochondries contenant la NADH déhydrogénase (FU et coll, 1990). La réduction de l'ADR par la xanthine-oxydase cytoplasmique est de moindre importance car le coeur humain est relativement déficient en cette enzyme (OLSON et coll, 1990).

3.1. Toxicité sur les organelles

3.1.1. Altération du réticulum sarcoplasmique.(microsomes).

Peroxydation lipidique.

L'initiation du phénomène peroxydatif peut être réalisée soit par le radical semiquinone ou l'anion superoxyde par action directe sur les acides gras polyinsaturés, soit par les radicaux hydroxyles issus du cycle d'HABER-WEISS ou provenant de la réduction directe du peroxyde d'hydrogène (MIMNAUGH et coll, 1981). La peroxydation lipidique induite par l'ADR nécessite des concentrations catalytiques de fer et un système réducteur (WINTERBOURN et coll, 1991).

Le fer semble jouer un rôle capital dans ce processus comme cela a été démontré sur plusieurs modèles:

La peroxydation de microsomes de coeur de souris est stimulée par l'ajout de fer dans le milieu réactionnel (POWIS, 1989). Dans un autre modèle microsomal, la peroxydation n'est que partiellement inhibée par la SOD et la catalase, mais elle est totalement inhibée par l'EDTA qui est un puissant chélateur du fer (VILE et coll, 1988b).

MINOTTI (1989a,b) a observé que la peroxydation des lipides microsomaux s'accompagne d'une réduction du fer (III) microsomal en fer (II). Fe (II) pourrait alors participer à l'initiation du processus oxydatif puisque cette réaction est inhibée par la déféroxamine.

Dans tous ces modèles, un complexe contenant le fer ferreux catalyserait la transformation des hydroperoxydes préexistants en radicaux alcoyles. De très faibles quantités d'hydroperoxydes sont nécessaires au déclenchement de cette réaction. Les radicaux lipidiques ainsi produits participeraient à des réactions en chaîne entraînant l'amplification du phénomène peroxydatif (WINTERBOURN et coll, 1991).

La peroxydation des lipides de la membrane microsomale s'accompagne d'une profonde désorganisation de l'architecture de cette structure et perturbe de ce fait l'activité biologique de ces organelles

Altération des enzymes du reticulum sarcoplasmique

La réduction de l'ADR au niveau de la membrane microsomale génère des espèces radicalaires capables d'inactiver les systèmes enzymatiques par oxydation de leurs groupements thiols.

Parmi ces systèmes enzymatiques, la Ca-ATPase, une enzyme riche en fonctions thiols, est particulièrement sensible aux espèces réactives de l'oxygène. Cette enzyme régule l'homéostasie calcique au niveau de la cellule: elle favorise la recapture du calcium du cytosol vers le réticulum endoplasmique. L'oxydation de ses groupements thiols par les ERO entraîne une déplétion du stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique ainsi que son relargage vers le cytoplasme cellulaire. HARRIS et coll.(1985) ont montré que la séquestration du calcium dans des microsomes cardiaques de rats incubés pendant 30 minutes avec de l'ADR (40 μ M) et le système NADH/NADH déshydrogénase était inhibée à 70%. Cette inhibition a été atténuée par la catalase et le glutathion réduit. Dans le même type d'expérience, l'incubation de microsomes de coeur de lapin avec de l'ADR (30 μ M) et du NADPH a entraîné une consommation de 25% des groupements thiols protéiques et une inhibition de 66% de l'activité de la Ca-ATPase. Le glutathion la catalase, la déféroxamine, dans ce système, restaurent presque totalement l'activité Ca-ATPasique, alors que les scavengers du radical $^{\circ}$ OH (mannitol, benzoate) ainsi que la vitamine E sont sans effets (VILE et coll, 1990).

La surcharge intracytoplasmique en calcium consécutive à l'inhibition de la Ca-ATPase peut entraîner des altérations lors de la contraction et lors de la relaxation des myofibrilles cardiaques.

3.1.2. Altération des mitochondries.

Les mitochondries sont très abondantes dans le muscle cardiaque par rapport aux autres organes. Leur attaque par les ERO issus du métabolisme oxydatif de l'ADR pourrait alors avoir de graves conséquences sur le fonctionnement de ce muscle (FU et coll, 1990).

Peroxydation lipidique

La réduction de l'ADR est réalisée au niveau du complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale. DOROSHOW (1983) a observé une production de radicaux superoxydes et de peroxyde d'hydrogène dans les mitochondries de rats en présence d'ADR et de NADH, malgré la présence naturelle de SOD et de catalase. Les capacités de détoxification des ERO seraient insuffisantes dans ces organelles.

Les radicaux ainsi produits sont à l'origine de la peroxydation lipidique de la membrane mitochondriale, ce phénomène nécessitant in vitro la présence de fer (GRIFFIN-GREEN et coll, 1988).

L'attaque radicalaire peut également entraîner une rigidification de la membrane mitochondriale, ce qui altère sa fluidité (LIN et coll, 1992).

Le complexe ADR-fer stimule la peroxydation lipidique (POWIS, 1989). Il perturbe également le transfert d'électrons dans la membrane mitochondriale.

Altération des enzymes mitochondriales.

Plusieurs systèmes enzymatiques sont altérés suite à l'attaque radicalaire induite par l'ADR.

-DEMAND et coll.(1991) ont rapporté une inhibition de la cytochrome C oxydase, une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction nécessite la présence de fer et est inhibée par la déféroxamine.

-Les enzymes du cycle de KREBS tels l'isocitrate déhydrogénase, l'alpha cétooglutarate déhydrogénase, la succinate déhydrogénase, et la malate déshydrogénase sont riches en groupements thiols. Leur altération perturbe le métabolisme énergétique de la cellule (GEETHA et coll, 1992).

-Une inhibition de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ a également été décrite (GEETHA et coll, 1992).

-L'altération de la Ca-ATPase , comme dans le cas du réticulum endoplasmique, diminue la séquestration calcique par ces organelles et contribue également à la surcharge intracytoplasmique en calcium.

3.1.3. Lésions ultrastructurales des mitochondries et des microsomes.

Les microsomes et les mitochondries sont donc deux sites privilégiés pour le métabolisme radicalaire de l'ADR. Leur atteinte histologique a été démontré par des études en microscopie électronique.

-Quatorze heures après injection d'une simple dose d'ADR à la souris, des changements dans l'ultrastructure des microsomes et des mitochondries cardiaques apparaissent. Ces lésions progressent en sévérité pour aboutir en 3 à 5 jours à une dégénération vacuolaire

des microsomes et une dislocation des mitochondries, ce qui entraîne une désorganisation des myofibrilles (OLSON et coll, 1990).

-Des lésions identiques à celles décrites par OLSON sont observées *in vitro* par LEE et coll.(1991) sur des muscles papillaires de coeur de rats en présence de 100 μM d'ADR. La catalase et le mannitol (scavenger spécifique du radical hydroxyle) réduisent l'intensité de ces lésions.

3.2. Toxicité myocardique *in vivo*.

Les effets de la production radicalaire engendrée par l'ADR ont été observés dans le muscle cardiaque lors d'études *in vivo*.

-L'injection d'une simple dose d'ADR à la souris s'accompagne en 48 heures d'une augmentation très significative du taux de MDA dans le myocarde (ODOM et coll, 1992).

-L'administration chronique d'ADR au lapin entraîne une augmentation des hydroperoxydes cardiaques mesurés par chimioluminescence (LLESUY et coll, 1990). Dans une expérience parallèle, l'administration de 4-épidoxorubicine, qui est une anthracycline moins cardiotoxique et potentiellement moins génératrice de radicaux libres que l'ADR, n'entraîne pas d'augmentation du taux d'hydroperoxydes par comparaison aux taux retrouvés chez les animaux non traités.

Chez l'animal, il existe une corrélation étroite entre la toxicité cardiaque des anthracyclines *in vivo* et leur potentiel électrochimique de génération d'espèces radicalaires oxygénées. Les dérivés 5 imino-anthracyclines connus pour être moins cardiotoxiques, sont de moins puissants générateurs de RLO que les anthracyclines comme l'ADR et la daunorubicine (LOWN et coll, 1982).

Le coeur a une plus faible capacité à détoxifier les RLO que les autres tissus, ce qui le rend plus susceptible aux attaques radicalaires induites par l'ADR. Comparativement aux autres tissus, le myocarde possède de faibles quantités de SOD, de catalase, et de glutathion transférase (GREEN et coll, 1984). L'administration d'ADR entraîne de surcroît une diminution de l'activité de la GPX et une déplétion du taux de glutathion réduit (KEIZER et coll, 1990).

3.3. Effets indirects des ERO dans la cardiotoxicité de l'ADR.

En plus de leur toxicité directe à différents niveaux de la cellule myocardique, les ERO générées par l'ADR peuvent promouvoir le développement d'autres réactions toxiques.

-La surcharge calcique intracellulaire consécutive à l'altération des Ca-ATPases sarcoplasmiques et mitochondriales activent les systèmes autolytiques Calcium-dépendants comme les phospholipases et les protéases non lysosomales (POWIS, 1989).

-Ils favorisent le relargage de l'histamine par les mastocytes. L'administration d'histamine au lapin provoque des lésions cardiaques similaires à celles engendrées par l'ADR (BRISTOW et coll, 1983). Les inhibiteurs du relargage de l'histamine (théophylline et cromoglycate disodique) atténuent l'intensité des lésions cardiaques induites par l'ADR. Le rôle de l'histamine dans la cardiotoxicité n'est cependant pas bien défini; elle pourrait favoriser l'influx calcique en agissant sur les récepteurs H2 et causer des arythmies par interaction avec les récepteurs H1 myocardiques.

-

3.4. Effet des antioxydants sur le stress oxydatif induit par l'ADR.

Dans le but de réduire la cardiotoxicité de l'ADR, de nombreux auteurs ont orienté leur recherche sur le rôle protecteur que pourraient jouer certaines molécules antioxydantes. De nombreuses molécules ont ainsi été testées lors d'études in vitro ou in vivo sur différents modèles animaux. Les résultats des essais de quelques antioxydants sont présentés dans le tableau 7.

Les effets bénéfiques observés avec ces antioxydants conforte l'hypothèse radicalaire dans les mécanismes d'altération des différents constituants de la cellule myocardique. Devant ces résultats encourageants, certaines molécules ont également fait l'objet d'essais cliniques lors de l'administration chronique d'ADR aux malades. L'effet protecteur s'est alors révélé plus mitigé.

-La vitamine E, qui est protectrice de la cardiotoxicité aigüe chez l'animal, ne protège pas les malades de la cardiotoxicité induite par l'administration chronique d'ADR (LEGHA et coll, 1982).

-L'ICRF-187 est un analogue liposoluble de l'EDTA. Ce produit est capable de s'hydrolyser au niveau cardiaque pour générer un dérivé très avide de fer. Ce dérivé chélaterait ainsi le fer nécessaire à la formation du radical °OH et à la peroxydation lipidique. Des résultats encourageants ont été observés lors des premiers essais thérapeutiques de cette molécule (DOROSHOW, 1991).

ANTIOXYDANT	MODELE	IN VIVO OU IN VITRO	RESULTATS / PARAMETRES MESURES	REFERENCES
Acide salviafolique	mitochondries cardiaques de rat	in vitro	↓ MDA	LIN et coll, 1992
Vitamine E	mitochondries cardiaques de rat	in vivo	↑ SH totaux ↓ peroxydes lipidiques	GEETHA et coll, 1992
N-acyl déhydroalanine	mitochondries cardiaques de souris	in vivo et in vitro	↓ MDA	BUC CALDERON et coll, 1990
Acide oléanique	microsomes cardiaques de rat	in vitro	↓ MDA	BALANEHRU et coll, 1992
β carotène	microsomes cardiaques de lapin	in vitro	↓ peroxydation lipidique	VILE et coll, 1990
Glutathion réduit	coeur de rat	in vivo	↑ SH non protéiques	VILLANI et coll, 1991
PZ 51 (Ebselen)	coeur de souris	in vivo	↓ MDA	PRITSOS et coll, 1992
PBN (spin-trap)	oreillette de rat	in vitro	↓ effet inotrope négatif	MONTI et coll, 1991

Tableau 7: Effet de certains antioxydants sur la peroxydation induite par l'ADR dans les tissus ou fractions de tissus cardiaques.

4. RESISTANCE TUMORALE A L'ADRIAMYCINE ET SYSTEMES DE DEFENSES ANTIRADICALAIRES.

Dans la majeure partie des cas, les mécanismes de défense de la cellule tumorale lorsqu'ils sont décrits dépendent du glutathion et surtout des enzymes glutathion dépendantes comme la Glutathion Transférase et la Glutathion Peroxydase sélénodépendante.

Le glutathion, s'il est par lui même scavenger de radicaux libres, joue plutôt le rôle de cofacteur de ces 2 enzymes dans la lutte antiradicalaire.

4.1. La glutathion S-transférase.

La famille des glutathion S-transférases comprend plusieurs isoenzymes. Certaines isoenzymes catalysent la conjugaison du glutathion aux intermédiaires électrophiles de médicaments anticancéreux pour les inactiver et les éliminer. L'isoenzyme π est celle qui a suscité le plus de travaux et de controverses. Cette isoenzyme est sans doute induite ou sélectionnée sous l'effet du stress oxydatif provoqué par les anthracyclines. Elle peut jouer un rôle important dans la détoxification des peroxydes organiques formés secondairement à la génération de radicaux oxygénés. Son activité peroxydasique lui permet de se substituer à la Glutathion Peroxydase sélénodépendante, lorsque celle-ci fait défaut. De fortes activités en Glutathion S-transférase ont été observées dans des tumeurs humaines et plus spécialement les adénocarcinomes du colon, du sein, et des poumons. De même, l'analyse des ARN messagers de la Glutathion S-transférase a révélé des taux 2 à 4 fois plus élevés dans les tumeurs du poumon, du colon, des ovaires et de l'estomac, par rapport aux tissus normaux d'origine. Ces observations peuvent suggérer un rôle fonctionnel de la Glutathion S-transférase dans la résistance de certains types de tumeurs aux anthracyclines (SINHA et coll, 1990).

4.2. La glutathion peroxydase sélénodépendante.

La Glutathion Peroxydase sélénodépendante est l'enzyme de détoxification des ERO comme le Peroxyde d'Hydrogène et les Hydroperoxydes organiques. Au sein des enzymes intervenant dans la lutte antiradicalaire (SOD, Catalase), la GPX semble jouer un rôle majeur puisque de nombreuses études sur des tumeurs résistantes à l'ADR ont montré une augmentation significative et généralement isolée de l'activité de cette enzyme (SINHA et coll, 1990).

La déplétion artificielle du glutathion, cofacteur de la GPX, par la buthionine sulfoxime augmente la cytotoxicité de l'ADR dans les cellules résistantes. Ce phénomène a été démontré sur des cellules de cancer du sein résistantes à l'ADR, où la diminution du glutathion a partiellement limité la résistance.

L'hyperexpression du glutathion en relation avec celle de la GPX interviendrait dans l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène et participerait à la diminution de la genèse du radical hydroxyle dans les cellules résistantes à l'ADR. Ce phénomène serait en faveur de l'implication des ERO dans la cytotoxicité de l'ADR; l'augmentation de l'activité de la GPX sélénodépendante contribuerait également significativement à la résistance de la cellule.

4.3. Quelques exemples.

Plusieurs auteurs ont évalué l'importance des enzymes antiradicalaires dans les mécanismes de résistance de certaines tumeurs à l'ADR. Les résultats de quelques-unes de ces études figurent dans le tableau 8.

TUMEURS	GST	GPX	SOD	CAT.	REFERENCES
MCF7 du sein humaine (MDR)	↑↑ (isoenzyme π)	↑↑	↑	=	SINHA et coll, 1990
SW 60 colique humaine (MDR)	↑ (isoenzyme π)	n.d.	n.d.	n.d	RAMU et coll, 1984
Erythroleucémique murine (MDR)	↑	↑↑	↓	↓	SCHISSELBAUER et coll, 1989
P388 leucémique murine	n.d.	↑	=	↓	CHUCK et coll, 1991
C6 glioblastome de rat (MDR)	↑	↑↑	n.d.	n.d.	BENCHEKROUN et coll, 1990
HTC hépatome de rat (MDR)	n.d.	↑	n.d.	n.d.	BENCHEKROUN et coll, 1990

Tableau 8: Activités en enzymes antioxydantes dans certaines tumeurs résistantes à l'ADR (par rapport au tissu d'origine non résistant à l'ADR).

(n.d.=non déterminé, GST=glutathion S-transférase, GPX=glutathion peroxydase, SOD=superoxyde dismutase, CAT=catalase).

Les phénomènes de détoxification contre la formation des RLO par les anthracyclines peut être considéré comme un mécanisme possible de résistance des cellules tumorales. La lutte contre les ERO pourrait survenir en complémentarité du ou des mécanismes impliqués dans le phénotype MDR et renforcer ainsi la résistance de la tumeur aux anticancéreux générateurs de RLO dont fait partie l'ADR (BENCHEKROUN et coll, 1990).

L'Hyperexpression des enzymes antiradicalaires dans les tumeurs résistantes à l'ADR n'a pas toujours pu être observée; c'est le cas par exemple pour une lignée

myélomateuse humaine 40 fois résistante à l'ADR où aucune augmentation de la GST ni de la GPX n'a pu être mesurée (BELLAMY et coll, 1989). Ces résultats peuvent cependant suggérer que les RLO sont un des paramètres parmi d'autres impliqués dans la cytotoxicité de l'ADR, s'exprimant vraisemblablement différemment selon la nature de la tumeur et donnant par conséquent des réponses variables dans l'intensité de la résistance.

PARTIE EXPERIMENTALE

1. INTRODUCTION

Beaucoup d'hypothèses ont été émises concernant les mécanismes biochimiques responsables de la cardiotoxicité de l'ADR. Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'hypothèse radicalaire de toxicité de ce produit.

L'ADR, après activation par les flavoprotéines cellulaires, génère des radicaux libres capables d'exercer des effets délétères à différents niveaux de la cellule. Dans le muscle cardiaque, cette toxicité pourrait être due à une sensibilité particulière des fractions subcellulaires des cellules myocardiques au stress oxydatif engendré par l'ADR. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons comparé les susceptibilités de microsomes cardiaques, hépatiques, rénaux, et pulmonaires de rats à la peroxydation induite par l'ADR en mesurant deux marqueurs: le MDA comme marqueur de la peroxydation lipidique et la consommation des groupements thiols comme marqueur de la peroxydation protéique. L'effet de la N-acétylcystéine et de l'acide rétinoïque sur la peroxydation lipidique a également été évalué. Les statuts en NADPH cytochrome P-450 réductase, en acides gras polyinsaturés, les teneurs en fer et zinc ainsi qu'en vitamine E ont aussi été déterminés dans les différents microsomes.

2. MATERIEL ET METHODES.

2.1. MODELE EXPERIMENTAL: LES MICROSOMES TISSULAIRES DE RAT.

Les microsomes sont des fractions cellulaires constituées d'un mélange de réticulum endoplasmique rugueux (réticulum avec ribosomes) et de ribosomes libres. Ce sont des microparticules sphériques obtenues lors de l'homogénéisation du tissu. Ils sont constitués d'une membrane phospholipidique contenant les systèmes enzymatiques. Différentes enzymes, impliquées dans le métabolisme des médicaments et leur activation, sont présentes dans les fractions microsomales, en particulier les enzymes du système cytochrome P-450 telles que les NADPH cytochrome P-450 oxydo-réductases. D'autres enzymes comme la Ca-ATPase, l'acyl-COA désaturase, l'hydroxyméthylglutaryl COA réductase sont impliquées respectivement dans le maintien de l'homéostasie calcique intracellulaire, dans l'élongation des acides gras insaturés, et dans la synthèse du cholestérol.

2.1.1. Préparation des microsomes tissulaires.

Plusieurs techniques existent pour séparer les microsomes. La filtration sur gel et la précipitation acide ont l'inconvénient d'inactiver les enzymes appartenant au cytochrome P-450. L'ultracentrifugation différentielle, qui n'a pas cette inconvénient, est la méthode que nous avons retenue.

Matériel.

- Homogénéisateur Potter.
- Tubes en polycarbonate.
- Ultracentrifugeuse Beckman réfrigérée (rotor 40).
- Rats Wistar mâles obtenus auprès de Iffa Credo. Les animaux âgés de 6 semaines sont maintenus pendant 5 jours sous un régime standard avant sacrifice.

Méthode.

Chaque rat est anesthésié au pentobarbital et les organes (foie, reins, coeur, poumons) sont rapidement prélevés puis lavés plusieurs fois dans du sérum physiologique glacé pour éliminer la plupart des globules rouges.

Les différents organes sont alors pesés, découpés en petits morceaux, dilués dans du tampon Tris 10 mM, KCl 150 mM pH 7,4 au 1/5 (P/V), puis homogénéisés au potter, dans la glace, pendant 1 à 2 minutes selon les tissus.

L'homogénat est ensuite centrifugé à 750 g pendant 10 minutes, le culot formé de globules rouges et de débris cellulaires est éliminé. Le surnageant est centrifugé pendant 10 minutes à 20000 g à +4°C. Le culot constitué de la fraction mitochondriale (contenant les mitochondries, les lysosomes, et les peroxyosomes) est éliminé et le surnageant centrifugé est à 105000 g pendant une heure à +4°C. Le surnageant cytosolique ainsi obtenu est écarté. Le culot qui correspond à la fraction microsomale est resuspendu dans le tampon et recentrifugé à 105000 g pendant 30 minutes. Le surnageant est écarté. La fraction microsomale lavée est finalement remise en suspension dans la tampon, aliquotée et conservée à -80°C jusqu'à utilisation. La pureté de ces préparations est contrôlée par microscopie électronique.

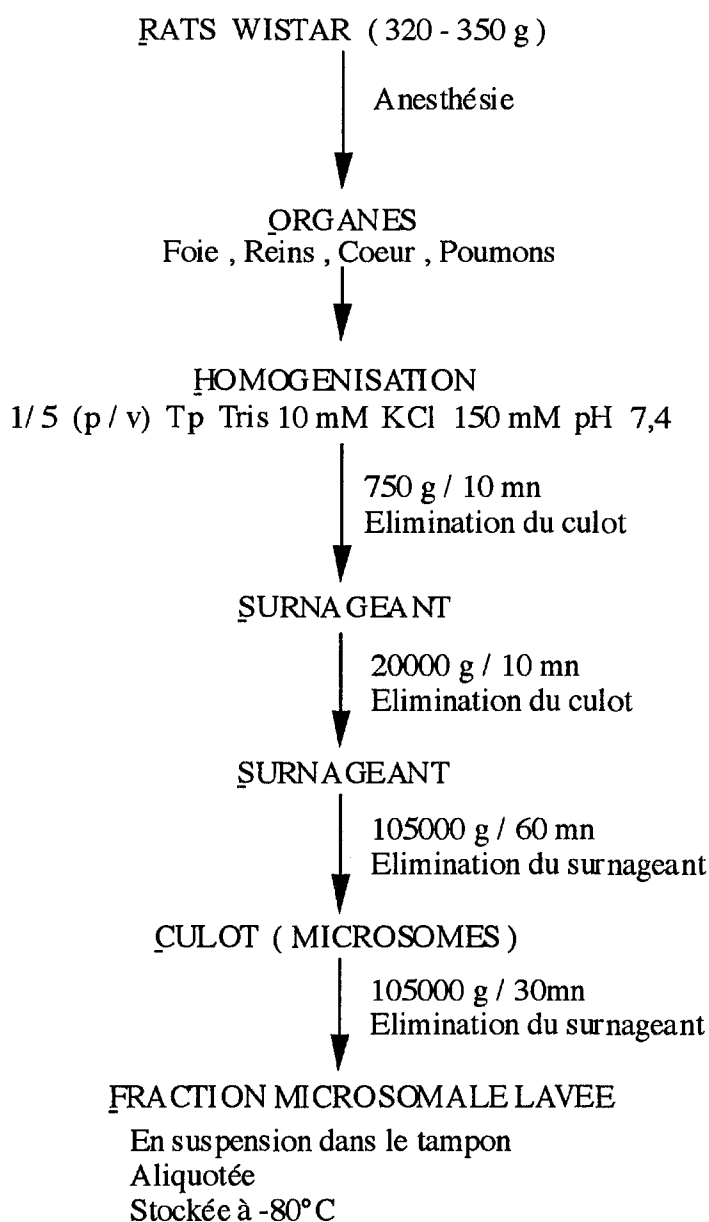


Figure 8: Les différentes étapes de préparation des microsomes tissulaires.

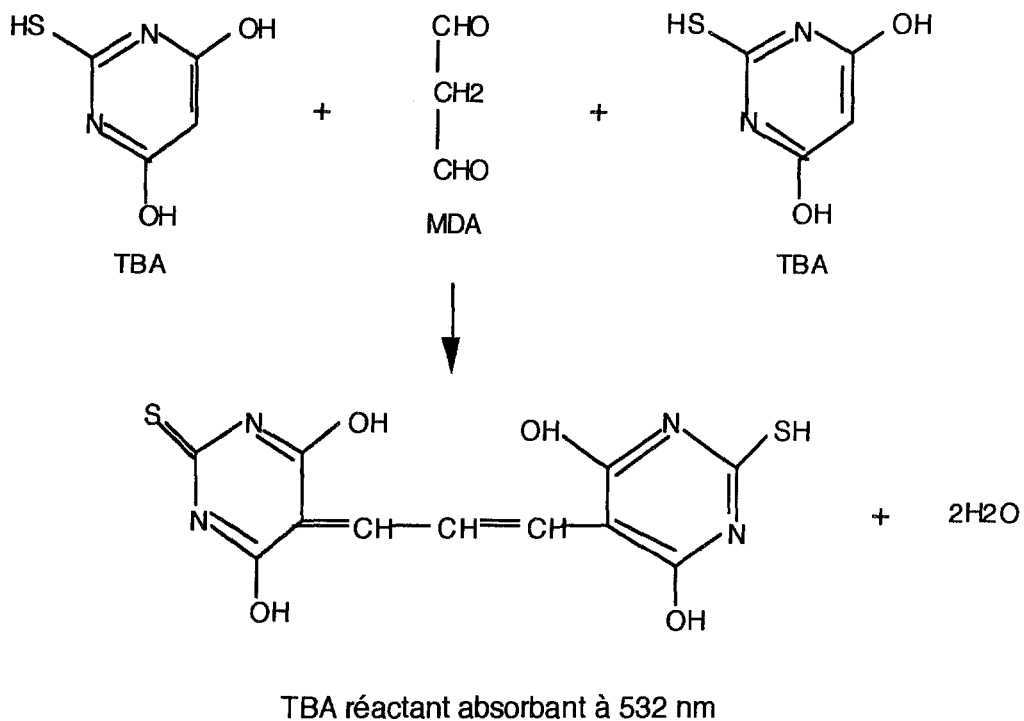
2.2. ETUDE DE LA PEROXYDATION MICROSOMALE INDUITE PAR L'ADR.

Nous avons retenu dans ce travail l'évaluation de deux types de marqueurs de la peroxydation: le MDA comme témoin de la peroxydation lipidique et la consommation des fonctions thiols comme marqueur de la peroxydation protéique.

2.2.1. Techniques de dosages et conditions opératoires.

2.2.1.1. Dosage du MDA.

Le MDA est un produit de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons. Les fonctions aldéhydiques du MDA réagissent avec deux molécules d'acide thiobarbiturique pour former un complexe coloré en rose dont le maximum d'absorption se situe à 532 nm. Les techniques colorimétriques et fluorimétriques étant sujettes à de nombreuses interférences, en particulier celles dues à l'absorption et à la fluorescence de l'ADR à cette longueur d'onde, nous avons choisi comme méthode de dosage la chromatographie liquide haute performance (RICHARD et coll, 1992).



Matériel.

-Colonne (25 cm, Ø 4,6 mm), Ultrasphère ODS hypersil C18, 5 µm.

- Précolonne RP 18, 10 μm .
- Détecteur colorimétrique Kontron (532 nm).
- Programme utilisé: débit de 1 ml/mn.
:Volume d'injection: 50 μl .

La phase mobile est constituée par un mélange tampon phosphate (KH_2PO_4 0,05 M pH 6) /méthanol (58/42; V/V).

La solution de travail pour le dosage du MDA est constituée de deux volumes d'acide thiobarbiturique dilué (pH 7,4) et d'un volume d'acide perchlorique à 7%.

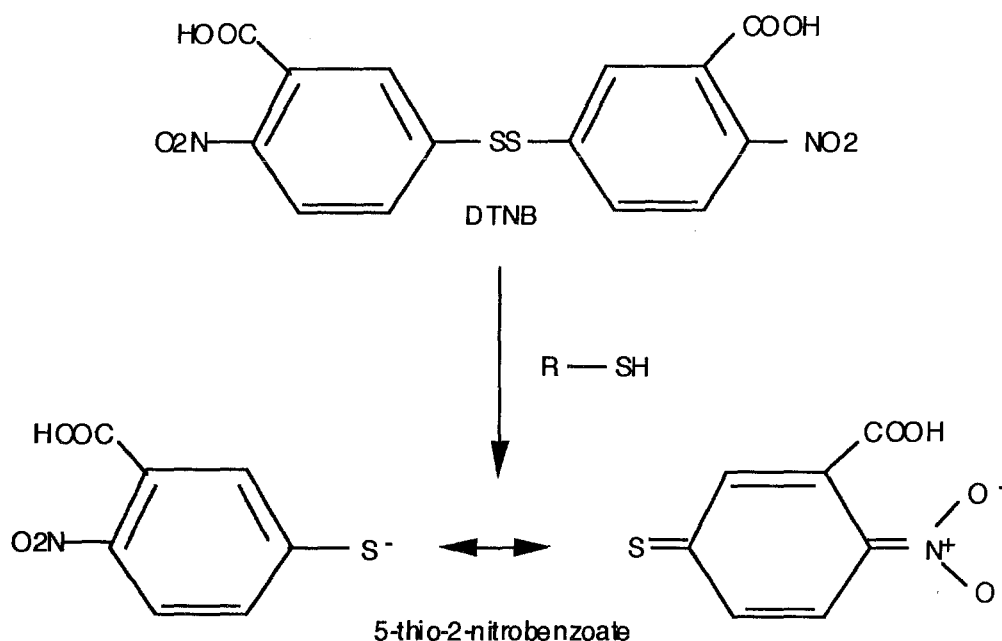
La courbe de calibration est obtenue à partir d'une solution de 1.1.3.3. tétraéthoxypropane (TEP) (0 à 12 $\mu\text{mol/l}$).

Méthode.

A 100 μl de mélange réactionnel ou de point de gamme, on ajoute 750 μl de solution de travail et 20 μl de butyl hydroxytoluène (BHT) à 2% dans l'éthanol absolu. Après une heure d'incubation à 95°C, les tubes sont refroidis dans de l'eau glacée et les mélanges réactionnels neutralisés par un tampon phosphate disodique 200 mM pH 11,5 avant d'être analysés par HPLC. Les protéines sont mesurées par la technique de LOWRY. Les résultats sont exprimés en μmoles de MDA/g de protéines microsomales.

2.2.1.2. Dosage des groupements thiols.

Les groupements thiols (SH) libres des protéines possèdent des propriétés réductrices sur le pont disulfure contenu dans le réactif d'Ellman ou (bis-(5-carboxy-4-nitrophényl)disulfide). Ce dernier libère des dérivés thiols aromatiques (anions 5-thio-2-nitrobenzoate) fortement colorés en jaune et mesurables par absorbance à 410 nm (JOCELYN, 1987).



Méthode.

Dans une microcuve, on introduit successivement:

-250 μ l de milieu réactionnel ou de point de gamme utilisant la N-acétyl cystéine (NAC)(0 à 200 μ M).

-350 μ l de tampon phosphate 0,05 M, EDTA 1 mM, pH 8.

-75 μ l de solution dénaturante de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 10% (P/V) dans le tampon phosphate.

On réalise une première lecture de DO à 410 nm appelée DO1.

On rajoute ensuite 100 μ l de réactif d'Ellman (DTNB) à 10 mM dans le tampon phosphate.

Le mélange est incubé 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité, puis on effectue une deuxième lecture de DO à 410 (DO2).

On trace la droite d'étalonnage $DO = DO1 - DO2$ en fonction de la concentration en groupement SH de la gamme, sachant qu'une molécule de NAC contient une fonction thiol.

Les protéines sont mesurées par la méthode de LOWRY.

Les résultats sont exprimés en μ moles de SH par g de protéines microsomales.

2.2.2. Choix des conditions opératoires: détermination de la concentrations optimale en NADPH.

La peroxydation microsomale induite par l'ADR nécessite la présence dans le milieu réactionnel d'un donneur d'électron cofacteur de la cytochrome P-450 réductase, le

NADPH. Nous avons déterminé la concentration optimale de NADPH dans la peroxydation des microsomes hépatiques en présence d'une concentration fixe en Adriamycine ($25 \mu\text{M}$) et après une incubation de 60 min à 37°C (la peroxydation est évaluée ici par le dosage du MDA).

La concentration en protéines microsomales est fixée à $0,25 \text{ g/l}$.

Pour permettre une étude comparative entre les différents tissus et entre les différents marqueurs de la peroxydation, les concentrations en NADPH et en protéines microsomales seront constantes tout au long de ce travail.

2.2.3. Etude des peroxydations lipidiques et protéiques induites par l'adriamycine sur les différents microsomes.

Les microsomes des différents tissus ($0,25 \text{ g}$ de protéines/l) sont incubés en présence de concentrations croissantes d'adriamycine ($10, 25, 50, 100, 200, 300 \mu\text{M}$) et de NADPH $2,5 \text{ mM}$. Le volume final réactionnel est de $0,5 \text{ ml}$. Les dosages du MDA et des groupements SH sont réalisés après une heure d'incubation à 37°C à l'obscurité.

2.3. DETECTION DES ESPECES REACTIVES OXYGENEES PRODUITE PAR L'ADRIAMYCINE PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE).

La détection des radicaux oxygénés dans les milieux biologiques est difficile à cause de leur forte réactivité et leur demi-vie très courte. L'utilisation d'un spin trap va permettre de piéger le radical pour former un dérivé radicalaire assez stable pour être détectable. Nous avons utilisé comme piègeur de spin le DMPO (5, 5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde).

Matériel.

-spectromètre ESR BRUKER modèle ER 100 D.

-pipettes Pasteur.

Méthode.

Le mélange réactionnel est constitué de microsomes et d'une concentration variable en adriamycine ($25 \mu\text{M}$ pour les microsomes hépatiques et cardiaques, $100 \mu\text{M}$ pour les autres microsomes).

On ajoute ensuite le DMPO (concentration finale 500 mM).

La réaction est déclenchée par du NADPH (concentration finale 2,5 mM). Le signal RPE est alors mesuré dans les deux minutes qui suivent à température ambiante.

2.4. EFFETS DES ANTIOXYDANTS SUR LA PEROXYDATION MICROSOMALE INDUITE PAR L'ADRIAMYCINE.

Les substances testées sont la N-acétylcystéine (NAC) et l'acide rétinoïque (AR). Elles sont ajoutées au mélange réactionnel (microsomes à 0,25 g de protéines/l, NADPH 2,5 mM) à des concentrations variables (0 à 1 mM pour la NAC, 0 à 200 μ M pour l'A.R.). Les essais de peroxydation sont effectués en l'absence et en présence d'adriamycine (25 et 100 μ M selon les microsomes) après 60 minutes d'incubation à 37°C. Le marqueur de la peroxydation mesuré ici est le MDA. La mesure des groupements SH n'a pu être réalisée en présence de ces deux antioxydants, d'une part parce que la NAC possède elle-même une fonction SH, et d'autre part parce que l'acide rétinoïque interfère sur la mesure colorimétrique des thiols aromatiques libérés par le DTNB.

2.5. DETERMINATION DE L'ACTIVITE CYTOCHROME P-450 REDUCTASE MICROSOMALE.

La cytochrome P-450 réductase est la flavoenzyme catalysant la réduction microsomale de l'adriamycine en présence de NADPH. La méthode de dosage dérive de celle utilisée par WILLIAMS (1962). Elle mesure la réduction du cytochrome C par l'enzyme en présence de NADPH.

Méthode.

Dans une microcuvette, on ajoute successivement:

-100 μ l de solution microsomale à 0,1 g de protéines/l.

-100 μ l de Triton à 1% (P/V) dans le tampon Tris 10 mM, KCl 150 mM pH 7,4.

Agiter au vortex puis rajouter:

-100 μ l de cytochrome C type 6 à 0,37 mM dans le tampon Tris KCl.

-600 μ l de tampon Tris KCl PH 7,4.

-100 μ l de NADPH à 1mM dans le tampon Tris KCl.

Suivre immédiatement la réduction du cytochrome C à 550 nm pendant 1 minute.

Les résultats sont exprimés en μ moles de cytochrome C réduit/mn/g de protéines microsomales.

2.6. DOSAGE DES ACIDES GRAS MICROSOMAU X.

Il est réalisé par chromatographie en phase gazeuse après avoir méthyler les acides gras pour les rendre plus volatiles.

Matériel

Chromatographie en phase gazeuse (CPG).

-colonne capillaire SGE BPX 70.

-détecteur: ionisation de flamme.

-volume d'injection: 1 μ l.

Le gaz porteur est l'hydrogène.

Méthode.

Dans un tube en verre, mélanger 500 μ l de solution microsomale (1 à 4 g de protéines/l), 200 μ l de standard interne C17:0, et 8 ml d'hexane-isopropanol (3/2).

Vortexer, agiter 30 minutes sur agitateur rotatif, puis centrifuger 10 minutes à 3500 tours/min.

Evaporer sous azote 7,2 ml de surnageant, puis ajouter 1ml de soude méthanolique 0,5N.

Mettre à l'étuve 10 minutes à 100°C.

Rajouter 700 μ l de BF₃-méthanol à 14%, agiter et remettre à l'étuve 10 minutes à 100°C.

Extraire avec 5 ml d'heptane, centrifuger, et évaporer 4,3 ml de phase supérieure sous azote. L'extrait est repris par 100 μ l d'hexane. 1 μ l de cette solution est injectée dans le CPG.

Une gamme étalon contenant les acides gras de C14 à C22:6 N3 est également réalisée. Les résultats sont exprimés en nmoles d'acides gras polyinsaturés/g de protéines microsomales.

2.7. DOSAGES DU FER ET DU ZINC MICROSOMAU X.

Ils ont été réalisés par spectrophotométrie d'absorption atomique au four.

Methode.

Pour le dosage du fer, les microsomes hépatiques sont dilués au centième, ceux de coeur et de reins au vingtième, ceux de poumons au dixième dans de l'eau déminéralisée. Une gamme étalon de fer (2, 5 à 20 $\mu\text{g}\%$) est également réalisée.

Pour le dosage du zinc, les microsomes hépatiques sont dilués au vingtième, les autres microsomes sont dilués au dixième dans de l'eau déminéralisée. La gamme étalon couvre les mêmes valeurs que celle du fer (2, 5 à 20 $\mu\text{g}\%$).

Les résultats sont exprimés en mg de fer et en μg zinc/ g de protéines microsomales.

2.8. DOSAGE DE LA VITAMINE E MICROSOMALE.

Il a été réalisé par chromatographie liquide haute performance.

Matériel.

-Colonne (15 cm, \varnothing 4,6 mm) phase Ultrasphère ODS 5 μm .

-Précolonne RP 18, 10 μm .

-Détecteur Colorimétrique Kontron (292 nm).

-Programme utilisé: débit 1, 5 ml/mn.

: volume d'injection: 50 μl .

La phase mobile est constituée par le mélange dichlorométhane-méthanol-acétonitrile dans les proportions 10-20-70.

Méthode

Dans un tube en verre, mélanger 1 ml de solution microsomale (1 g de protéines/l) et 100 μl d'étalon interne.

Agiter au vortex, puis ajouter 2 ml d'hexane BHT/isopropanol (4/1).

Agiter au vortex puis centrifuger 5 minutes à 2000 tours/min.

Prélever 1, 5 ml du surnageant et l'évaporer sous courant d'azote.

Reprendre le résidu d'évaporation par 150 μl de phase mobile, agiter au vortex et injecter dans l'HPLC.

Une gamme étalon de vitamine E (0 à 45 μM) est réalisée en parallèle. Les résultats sont exprimés en μmol de vitamine E/g de protéines microsomales.

3. RESULTATS.

3.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS OPERATOIRES.

Choix de la concentration en NADPH.

La concentration optimale en NADPH engendrant une peroxydation maximale est de 2,5 mM. Cette valeur sera retenue pour l'ensemble des expériences à suivre (fig 9).

MDA en $\mu\text{mol/g}$ de protéines/60 mn

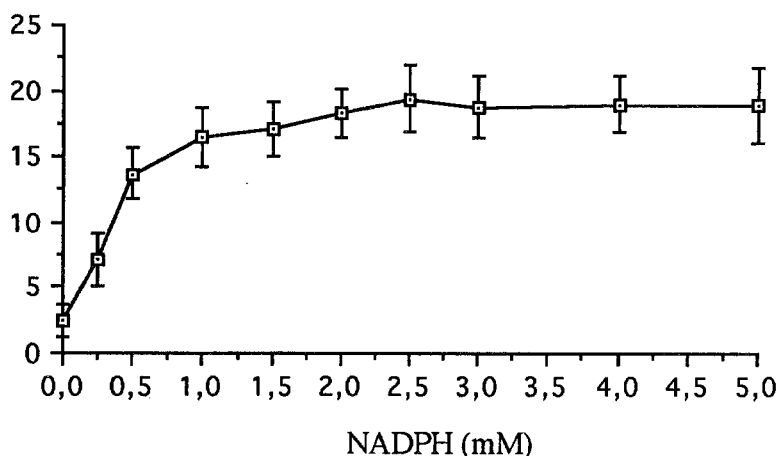


Figure 9: Effet de la variation de concentration en NADPH sur la peroxydation lipidique de microsomes hépatiques (0,25 g de protéines microsomaux/l) par l'adriamycine (25 μM). La peroxydation lipidique est mesurée par le taux de MDA après 60 minutes d'incubation à 37°C à l'obscurité. Chaque point est la moyenne \pm l'écart-type de 3 expériences.

3.2. ETUDE DE LA PEROXYDATION INDUITE PAR L'ADRIAMYCINE.

3.2.1. Sur les microsomes cardiaques.

Production de MDA.

La production de MDA par les microsomes cardiaques est maximale (10,7 $\mu\text{mol/g}$ de protéines) pour des concentrations en ADR de l'ordre de 25-50 μM . Ce taux de MDA est 2,5 fois supérieur à celui du témoin sans ADR. Pour des concentrations supérieures en ADR, on note une diminution de la production de MDA (fig 10)

Consommation des groupements thiols.

La consommation des fonctions SH est tout d'abord régulière puis se stabilise pour des concentrations en adriamycine de l'ordre de 50 μM . A cette concentration, le pourcentage de SH consommés par rapport au témoin sans ADR est de 16% (fig 11).

MDA en $\mu\text{mol/g}$ de protéines/60 mn

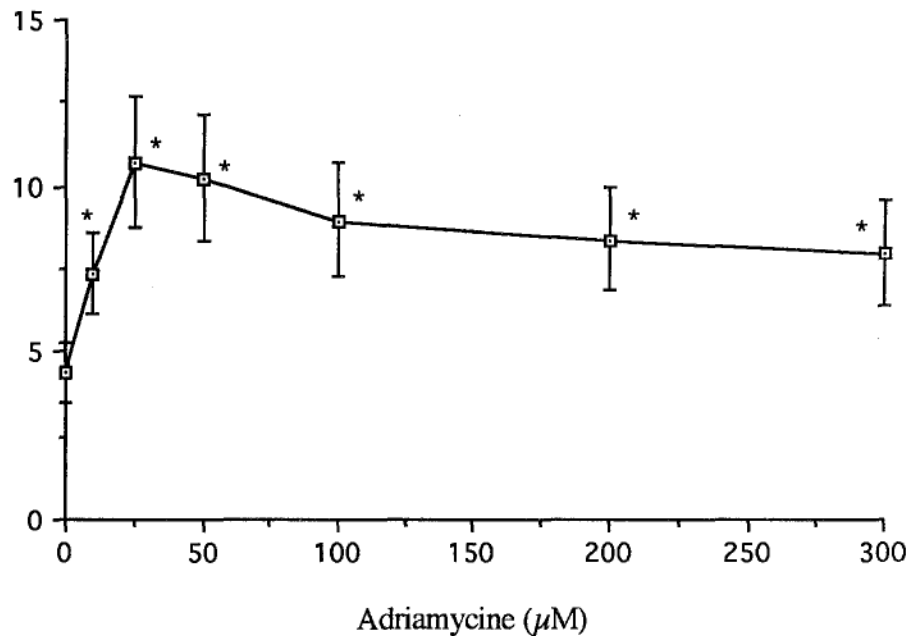


Figure 10: Effet de différentes concentrations d'adriamycine sur la production de MDA par les microsomes cardiaques. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 7 expériences. * $p < 0,05$ par rapport au témoin sans adriamycine (ANOVA). MDA natif (sans NADPH ni incubation): $0,85 \pm 0,12$, après 60 mn d'incubation: $1,93 \pm 0,31$.

$\mu\text{moles SH/g}$ de protéines/60 mn

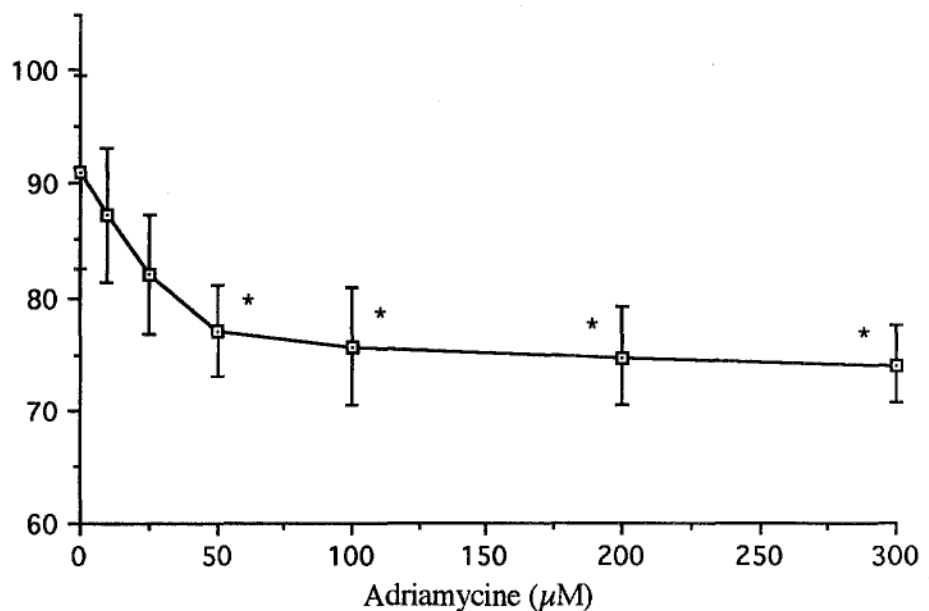


Figure 11: Effet de l'adriamycine sur la concentration en groupements thiols dans les microsomes cardiaques. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 7 expériences. * $p < 0,05$ par rapport au témoin sans adriamycine (ANOVA). SH natifs (sans NADPH ni incubation): $102 \pm 7,2$, après 60 mn d'incubation: $95,3 \pm 8,1$.

3.2.2. Sur les microsomes hépatiques.

Production de MDA.

L'incubation des microsomes avec le NADPH génère autour de $3,8 \mu\text{mol}$ de MDA / g de protéines après 1 heure à 37°C . En présence d'adriamycine, ce taux est significativement plus élevé avec un maximum de $18,3 \mu\text{mol}$ pour $25 \mu\text{M}$ d'ADR. La production de MDA n'est pas proportionnelle à la concentration d'ADR puisqu'à partir de $25-50 \mu\text{M}$, de plus fortes concentrations diminuent la formation de cet aldéhyde (fig 12).

Consommation des groupements thiols.

La consommation des groupements thiols microsomaux dans les mêmes conditions d'incubation est proportionnelle à la concentration en adriamycine. Elle atteint un plateau pour des valeurs de l'ordre de $50 \mu\text{M}$ d'ADR. Le pourcentage de thiols oxydés par rapport au témoin sans ADR est alors de l'ordre de 20% (fig 13).

MDA en $\mu\text{mol/g}$ de protéines/60 min

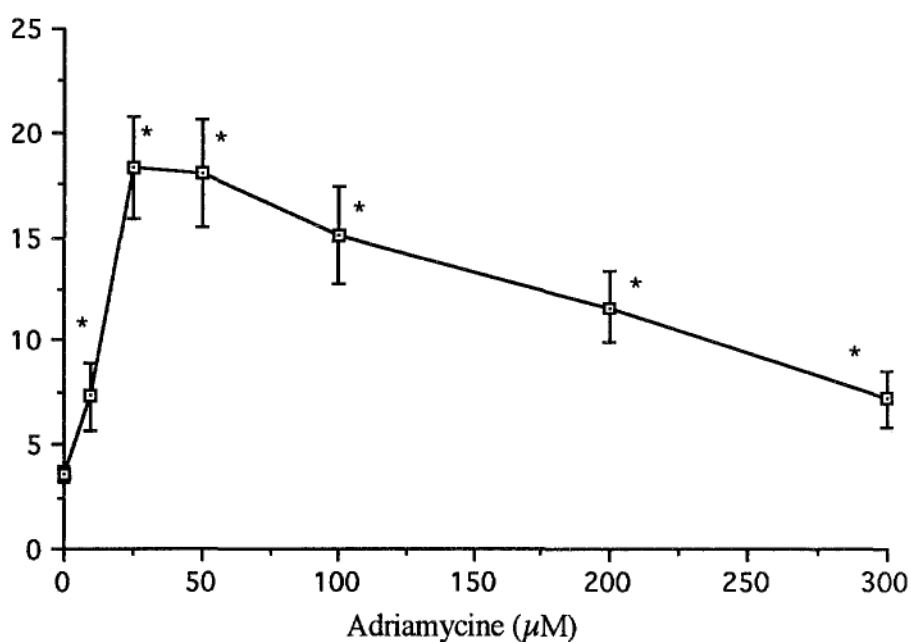


Figure 12: Effet de différentes concentration d'adriamycine sur la production de MDA par les microsomes hépatiques . Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 7 expériences. * $p < 0,05$ par rapport au témoin sans adriamycine (ANOVA). MDA natif $0,71 \pm 0,20$, après incubation $1,35 \pm 0,36$.

$\mu\text{moles SH/g de protéines /60 mn}$

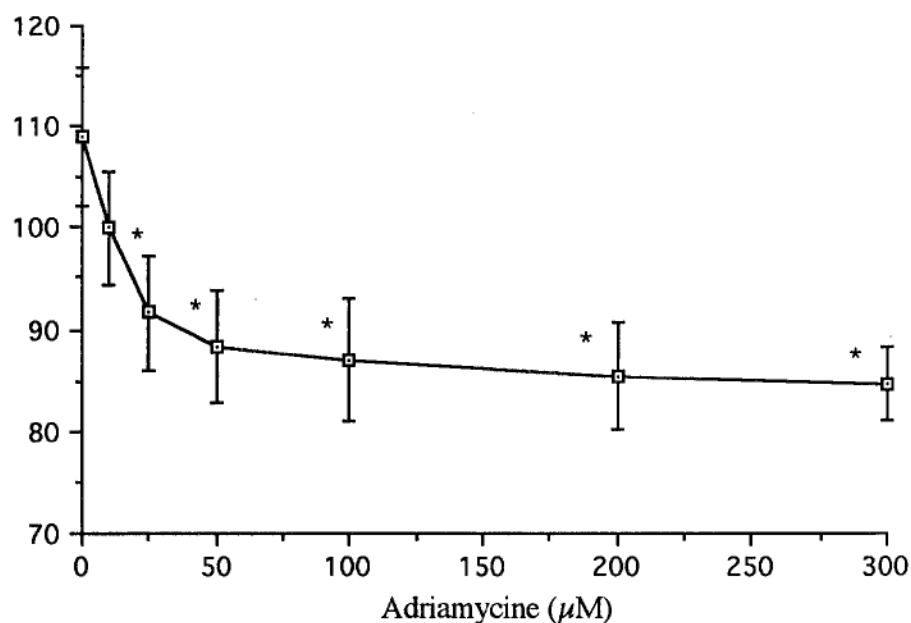


Figure 13: Effet de l'adriamycine sur la concentration en groupements thiols dans les microsomes hépatiques. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 7 expériences. * $p < 0,05$ par rapport au témoin sans adriamycine (ANOVA). SH natifs: $122 \pm 6,8$, après incubation $115,6 \pm 5,7$.

3.2.3. Sur les microsomes rénaux.

Production de MDA

La production maximale de MDA ($11 \mu\text{moles/g de protéines}$) est obtenue avec une concentration d'adriamycine de $100 \mu\text{M}$. Elle est 2,8 fois supérieure à celle du témoin sans ADR. Pour les concentrations supérieures, le taux de MDA produit diminue, pour atteindre une valeur proche de celle du témoin lorsque l'ADR est testée à $300 \mu\text{M}$ (fig 14).

Consommation des groupements thiols.

La concentration en fonction SH dans la préparation microsomale diminue régulièrement pour atteindre un plateau à partir de concentrations en adriamycine de l'ordre de $100 \mu\text{M}$. Au niveau du plateau, le pourcentage de thiols consommés est de 13% par rapport au témoin sans ADR (fig 15).

MDA en $\mu\text{mol/g}$ de protéines/60 mn

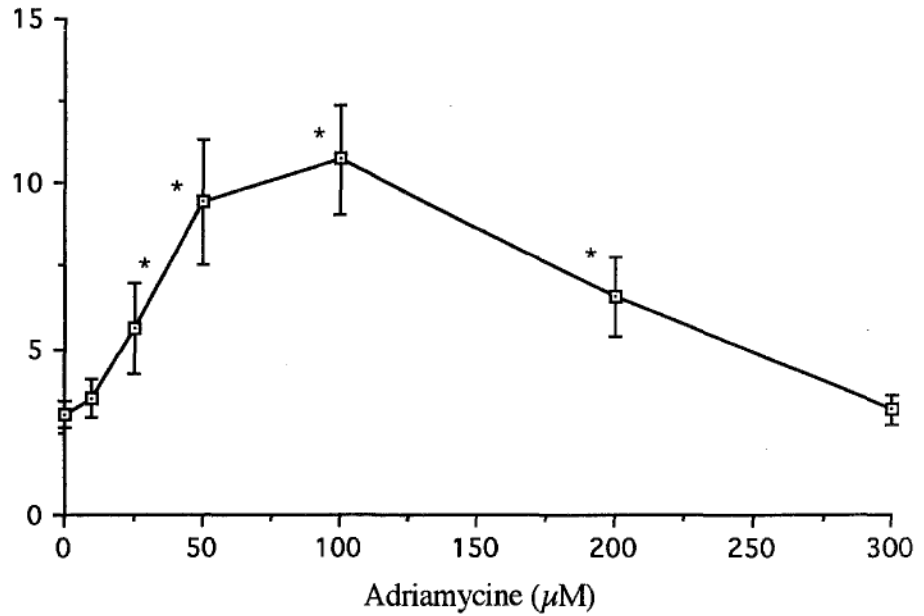


Figure 14: Effet de différentes concentrations d'adriamycine sur la production de MDA par les microsomes rénaux. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 7 expériences. * $p < 0,05$ par rapport au témoin sans adriamycine (ANOVA). MDA natif $0,33 \pm 0,04$, après incubation $0,62 \pm 0,15$.

$\mu\text{moles SH/g}$ de protéines/60 mn

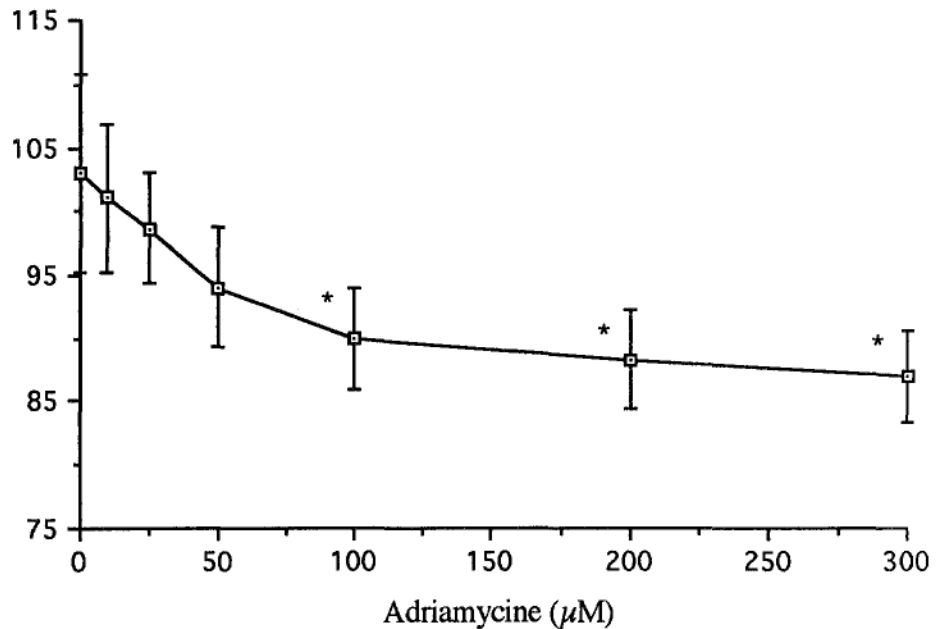


Figure 15: Effet de l'adriamycine sur la concentration en groupements thiols dans les microsomes rénaux. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 7 expériences. * $p < 0,05$ par rapport au témoin sans adriamycine (ANOVA). SH natifs $115,4 \pm 5,2$, après incubation $108,4 \pm 7,6$.

3.2.4. Sur les microsomes pulmonaires.

Production de MDA.

Quelle que soit la concentration testée en adriamycine, la production de MDA qui en résulte n'est pas significativement différente de celle du témoin sans adriamycine. (fig 16).

Consommation des groupements thiols.

Les concentrations en fonction SH dans les microsomes incubés en présence d'adriamycine sont pratiquement identiques à celle du témoin sans adriamycine (fig 17).

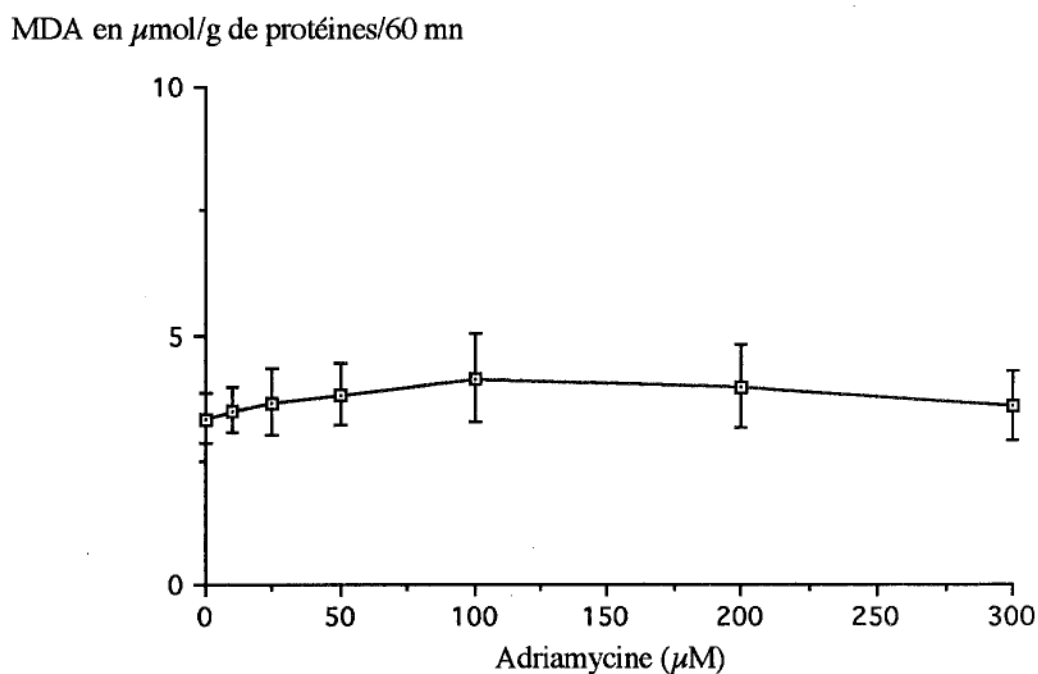


Figure 16: Effet de différentes concentrations d'adriamycine sur la production de MDA par les microsomes pulmonaires. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 7 expériences différentes. MDA natif: $0,53 \pm 0,07$, après incubation $1,26 \pm 0,35$.

$\mu\text{moles SH/g de protéines/60 mn}$

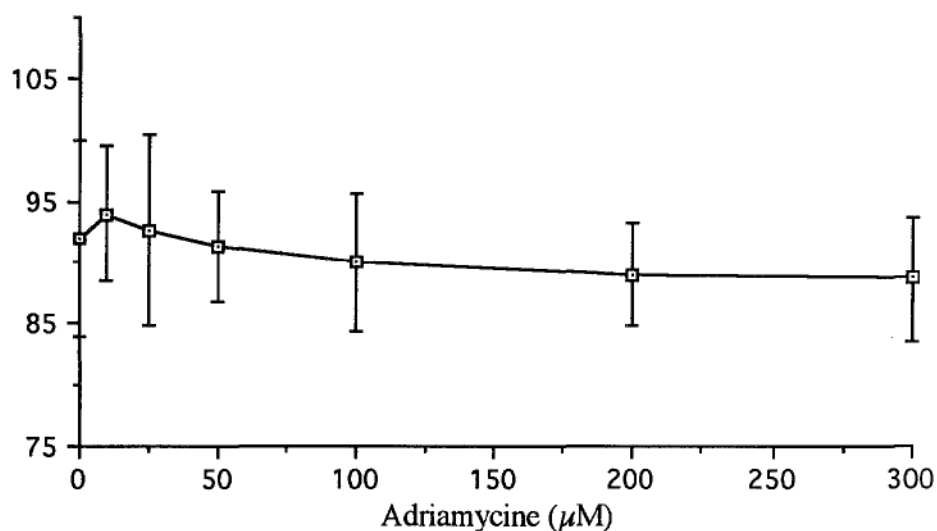


Figure 17: Effet de l'adriamycine sur la concentration en groupements thiols dans les microsomes pulmonaires. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 7 expériences. SH natifs: $102,8 \pm 8,2$, après incubation $97,6 \pm 6,7$.

3.2.5. Récapitulatif sur les différents microsomes.

La production de MDA et la consommation des groupements thiols induites par l'ADR dans les différents microsomes sont récapitulés dans les figures 18 et 19.

Production de MDA

La production de MDA est optimale avec $25 \mu\text{M}$ d'ADR dans les microsomes cardiaques et hépatiques. Elle est maximale avec $100 \mu\text{M}$ dans les microsomes rénaux, tandis que les microsomes pulmonaires ne sont pas sensibles à la peroxydation induite par l'ADR. Aux concentrations d'ADR supérieures à celle qui procure le maximum de peroxydation dans les microsomes sensibles, on observe une diminution de la génération du MDA. Cette diminution est particulièrement importante dans les microsomes hépatiques et rénaux (fig 18).

Consommation des groupements thiols

La consommation des groupements thiols dans les différents microsomes, à l'exception de ceux de poumons, est proportionnelle à la concentration d'ADR lorsque celle-ci varie de 0 à $50\text{-}100 \mu\text{M}$. A partir de ces concentrations, l'oxydation des groupements thiols se stabilise, mais ne diminue pas comme dans le cas du MDA lors de la peroxydation lipidique. Les microsomes pulmonaires, déjà résistants à la peroxydation lipidique induite par l'ADR, sont également résistants à la peroxydation protéique induite par cette drogue (fig 19).

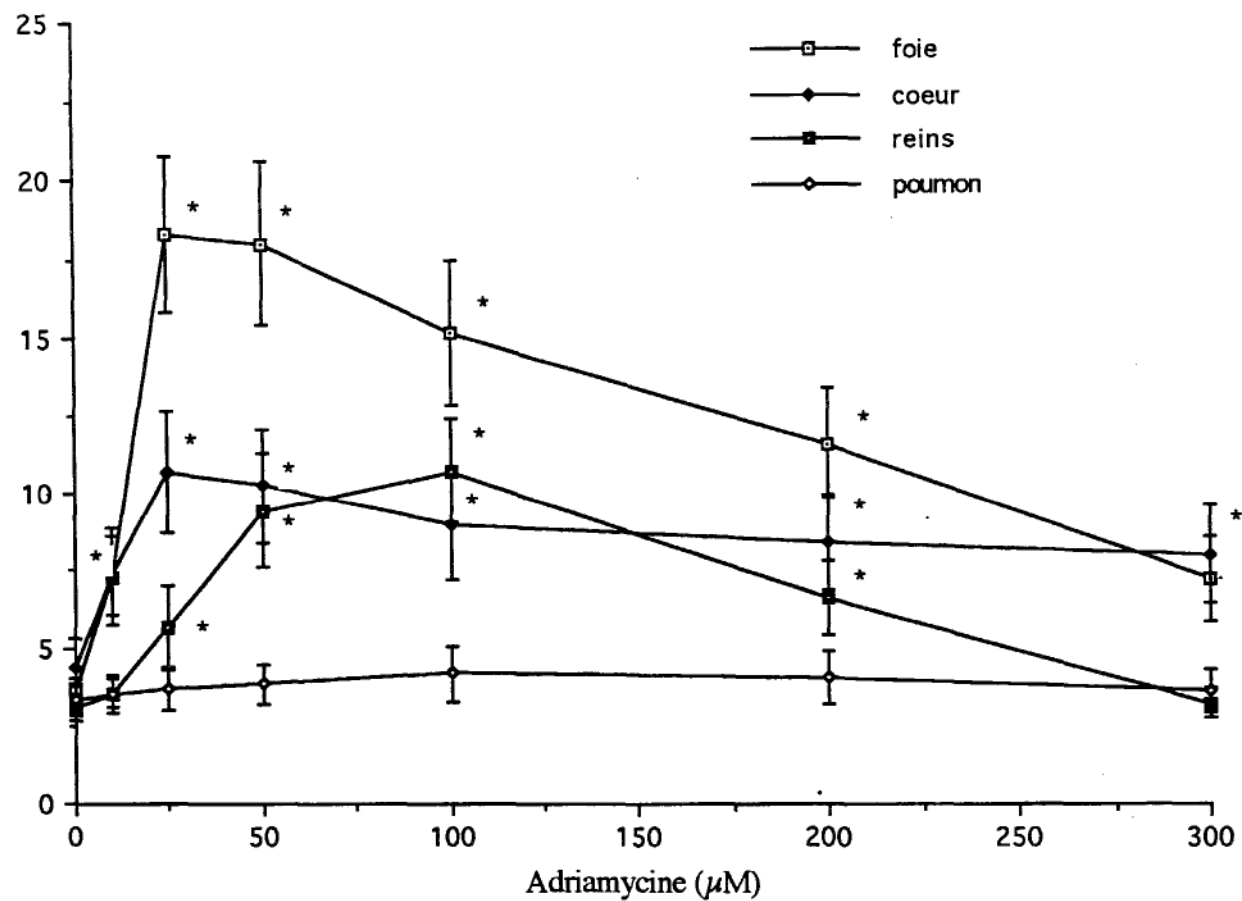
MDA en $\mu\text{mol/g}$ de protéines/60 mn

Figure 18: Effet de différentes concentrations d'adriamycine sur la peroxydation des microsomes tissulaires.

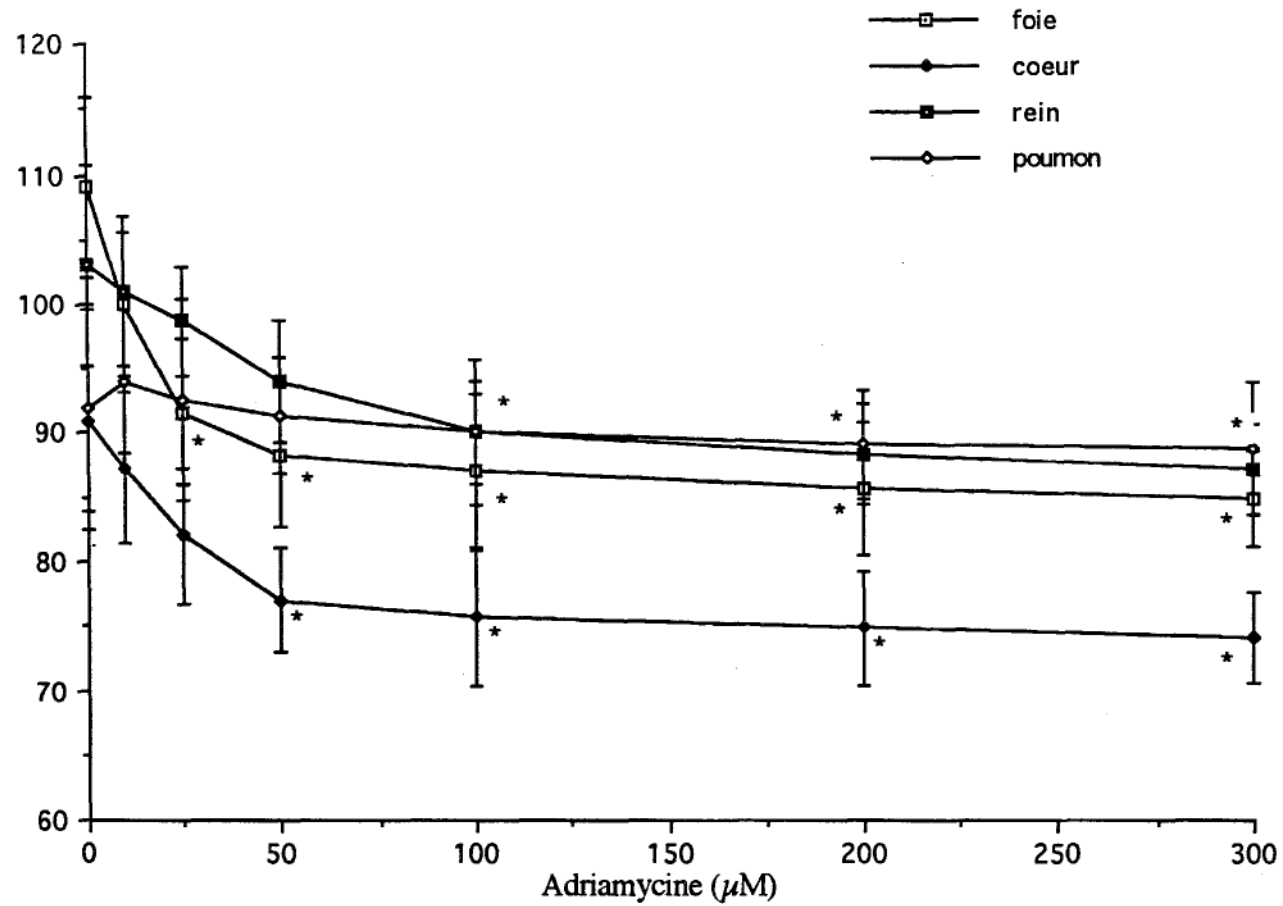
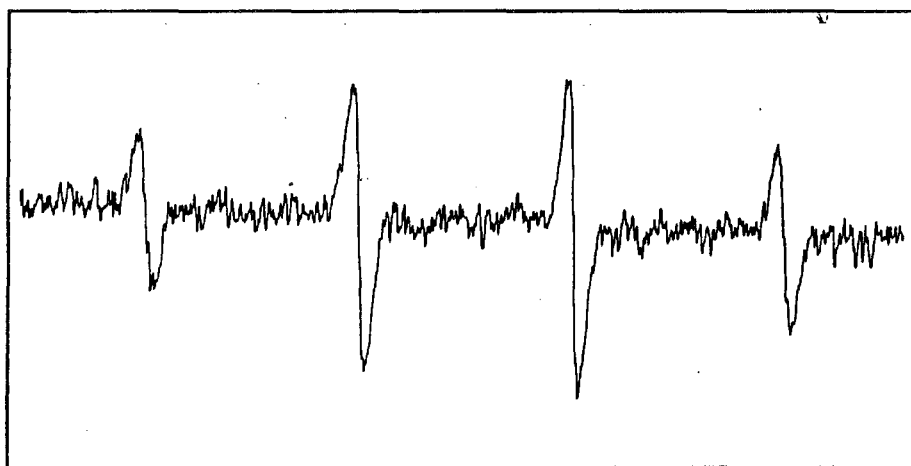
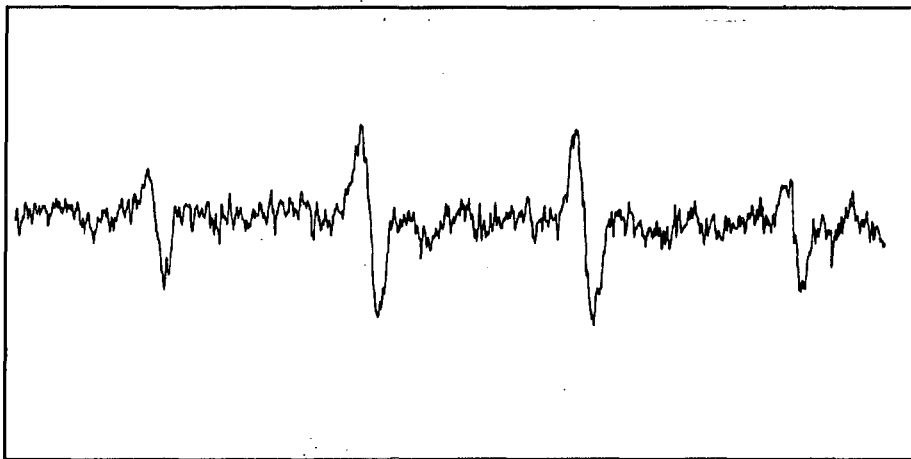
$\mu\text{moles SH/g de protéines}$ 

Figure 19: Effet de l'adriamycine sur la concentration en groupements thiols dans les microsomes tissulaires

3.3. DETERMINATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE PRODUITES PAR L'ADRIAMYCINE PAR RPE.

Lors de l'incubation de tous les microsomes tissulaires avec du NADPH, du DMPO et en présence ou en l'absence d'adriamycine, nous obtenons des spectres RPE dont le signal est caractéristique du spin adduit DMPO-OH. L'amplitude de ce signal est corrélée à la quantité de radicaux °OH produits dans le milieu réactionnel. L'ADR seule dans le tampon réactionnel génère également, par un transfert intramoléculaire d'électron, un signal de type DMPO-OH. Cependant, en tenant compte de ce phénomène, l'amplitude du signal observé dans les microsomes en présence de NADPH et d'ADR montre que le métabolisme microsomal de l'ADR génère des radicaux °OH. Les spectres RPE obtenus avec les microsomes cardiaques sont illustrés dans la figure 20.



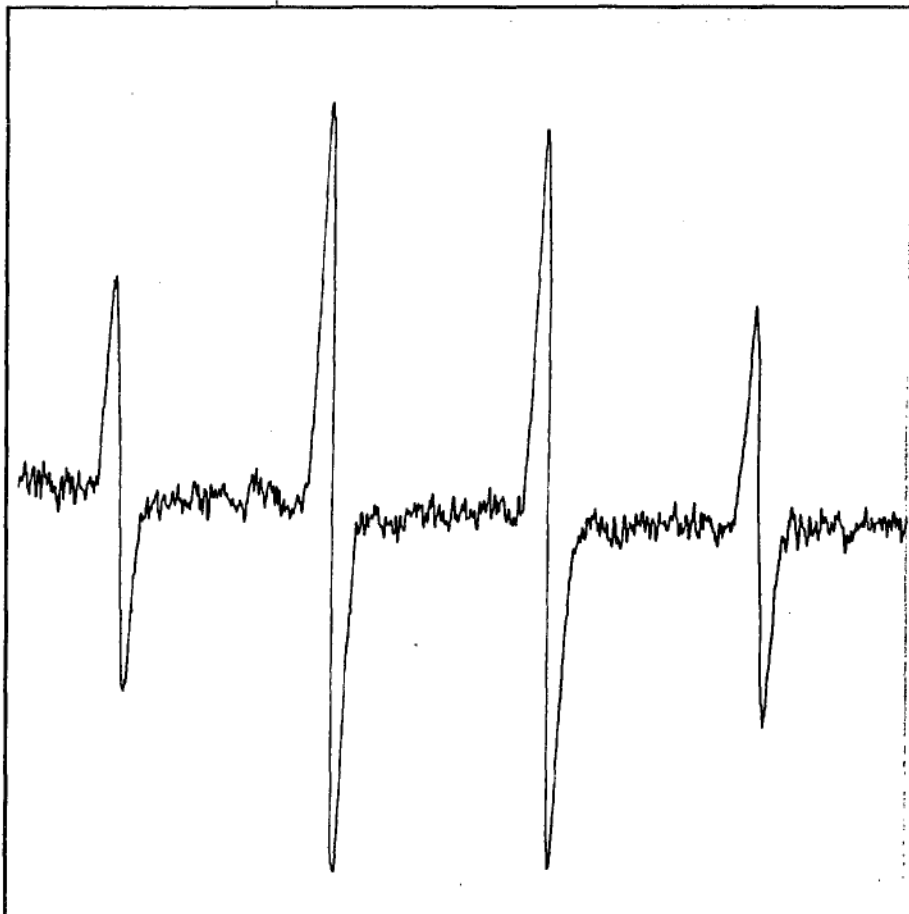


Figure 20: Spectres RPE de l'adriamycine 25 μM seule dans le tampon réactionnel (A), d'un mélange de microsomes cardiaques et de NADPH, en l'absence (B) et en présence (C) d'adriamycine 25 μM . Les spectres sont enregistrés dans les deux minutes qui suivent le démarrage de la réaction.

3.4. EFFET DES ANTIOXYDANTS SUR LA PEROXYDATION MICROSOMALE INDUITE PAR L'ADRIAMYCINE.

Nous avons testé différentes concentrations en acide rétinoïque et en N-acétylcystéine sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine. L'acide rétinoïque est utilisé ici comme antioxydant liposoluble capable de piéger les radicaux lipidiques et l'oxygène singulet. La NAC est plutôt un antioxydant hydrosoluble capable de piéger les radicaux $^{\circ}\text{OH}$ grâce à ses groupements thiols. Les concentrations en adriamycine sont fixées à 25 μM pour les microsomes hépatiques et cardiaques, à 100 μM pour les microsomes de rénaux. Les microsomes pulmonaires ne s'oxydant pas dans ce système sont exclus de cette étude. Le marqueur de la peroxydation est représenté par le MDA.

3.4.1. Effet de l'acide rétinoïque.

Sur la peroxydation des microsomes cardiaques.

L'acide rétinoïque aux concentrations testées ne protège pas les microsomes de la peroxydation lipidique induite par 25 μM d'adriamycine (fig 21).

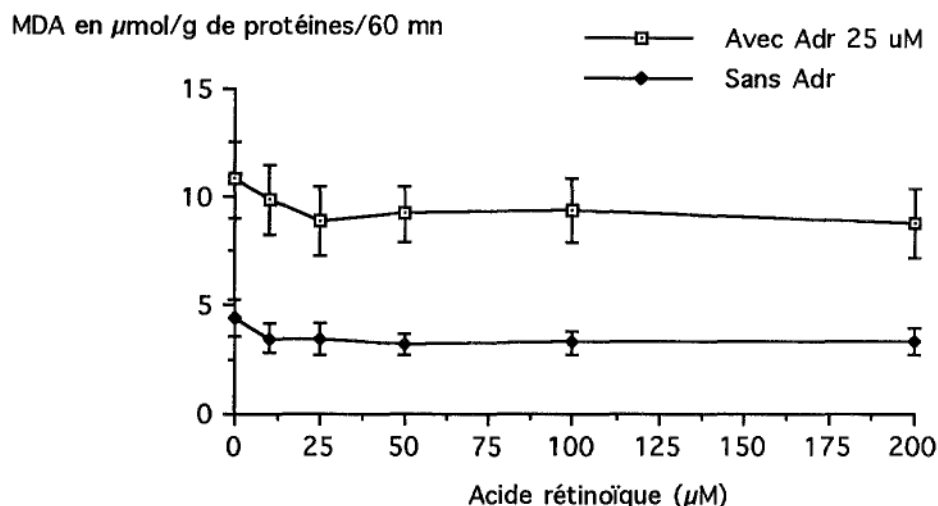


Figure 21: Effet de l'acide rétinoïque sur la production de MDA par les microsomes cardiaques en présence ou en l'absence d'adriamycine (25 μM). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 3 expériences.

Sur la peroxydation des microsomes hépatiques.

L'acide rétinoïque, à toutes les concentrations testées, protège pratiquement totalement les microsomes hépatiques de la peroxydation induite par 25 μM d'adriamycine (fig 22).

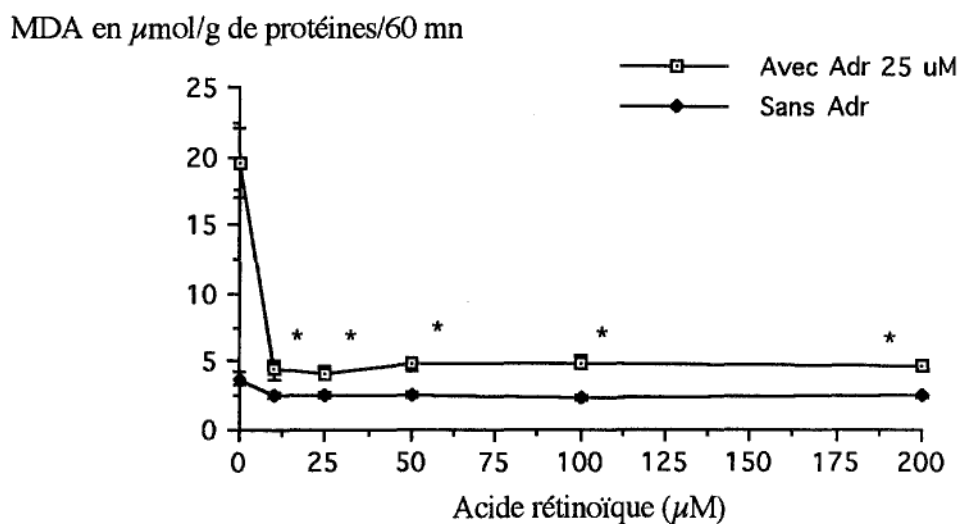


Figure 22: Effet de l'acide rétinoïque sur la production de MDA par les microsomes hépatiques, en présence et en l'absence d'adriamycine (25 μM). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type de 3 expériences. * $p < 0,05$ par rapport au témoin sans acide rétinoïque (student t.).

Sur la peroxydation des microsomes rénaux.

Comme dans le cas des microsomes hépatiques, l'acide rétinolique à la plus faible concentration utilisée protège de façon nette les microsomes rénaux de la peroxydation (fig 23).

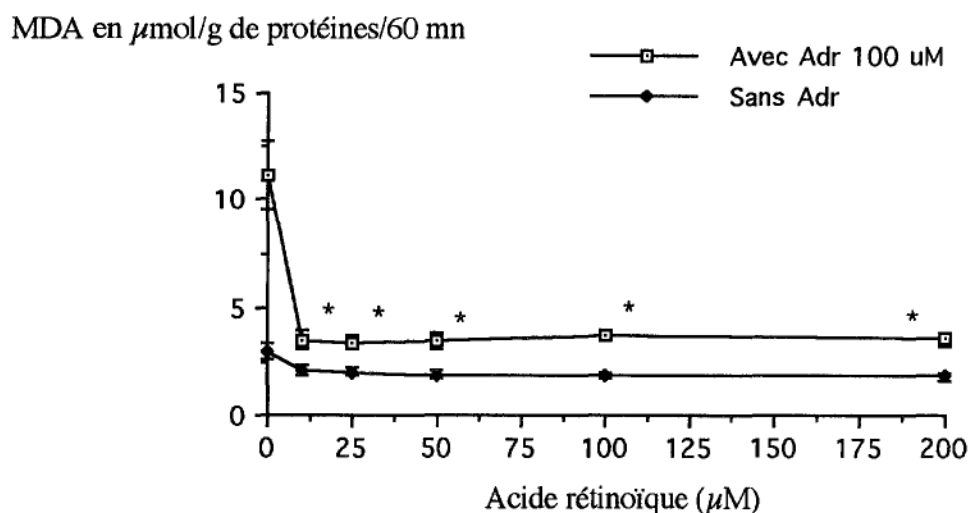


Figure 23: Effet de l'acide rétinolique sur la production de MDA par les microsomes rénaux en présence et en l'absence d'adriamycine (100 µM). Les résultats sont exprimés par la moyenne ± l'écart-type de 3 expériences. *p < 0,05 par rapport au témoin sans acide rétinolique (Student t.).

3.4 2. Effet de la N-acétylcystéine.

La NAC à toutes les concentrations testées ne prévient pas les microsomes tissulaires de la peroxydation lipidique induite par l'adriamycine (tab 9).

Drogue	MDA (µmol/g de prot/60 mn)		
	Coeur	Foie	Reins
0	4,3 ± 0,62	3,8 ± 0,5	3,2 ± 0,46
Adr	10,5 ± 1,8	18,2 ± 2,5	10,5 ± 1,7
Adr + NAC 100 µM	10,3 ± 1,6	18,1 ± 2,4	10,7 ± 1,4
Adr + NAC 250 µM	10 ± 2,2	17,9 ± 2,8	11 ± 1,5
Adr + NAC 500 µM	10,6 ± 2,4	17,3 ± 2,2	11,4 ± 2
Adr + NAC 750 µM	9,7 ± 1,6	17,8 ± 2,6	11,2 ± 1,8
Adr + NAC 1000 µM	10,1 ± 1,9	18,5 ± 2,4	10,9 ± 1,3

Tableau 9: Effet de différentes concentrations en NAC sur la production de MDA par les microsomes tissulaires en présence ou en l'absence d'adriamycine (25 µM pour les microsomes hépatiques et cardiaques, 100 µM pour les microsomes rénaux). Chaque valeur est la moyenne ± l'écart-type de 3 expériences différentes.

3.5. DETERMINATION DE L'ACTIVITE CYTOCHROME P-450 REDUCTASE MICROSOmale.

Cette enzyme permet l'activation de l'adriamycine en radical semi-quinone capable de déclencher un processus oxydatif. L'activité la plus faible est retrouvée dans les microsomes cardiaques (tab 10).

	Activité Cytochrome P-450 réductase (μmol de Cyt C réduit/mn/g de protéines)
Coeur	$5,16 \pm 0,90$
Foie	$88 \pm 14,8$
Reins	$8,7 \pm 0,71$
Poumons	$21,35 \pm 3,11$

Tableau 10: Activité cytochrome P-450 réductase dans les différents microsomes. Chaque valeur est la moyenne \pm l'écart-type de 5 expériences différentes.

3.6. DOSAGES DES ACIDES GRAS POLYINSATURES MICROSOmaux.

Les acides gras polyinsaturés possédant au moins trois double-liaisons sont très sensibles aux attaques radicalaires. Les microsomes cardiaques en sont les plus riches.

	AGPI (1) (nmol/g de prot)	C 18 : 3 %	C 20 : 3 %	C 20 : 4 %	C 20 : 5 %	C 22 : 4 %	C 22 : 5 %	C 22 : 6 %
Coeur	185 ± 16	0,8	1,1	51,3	0,5	2	7	37,3
Foie	138 ± 17	0,9	3	68,8	1,7	0,9	2,3	22,4
Reins	113 ± 18	n.d.	2,5	85,4	1,7	1,1	1,1	8,2
Poumons	122 ± 14	n.d.	3,3	58,8	1,6	15	8,3	13

Tableau 11: Concentrations et pourcentages en acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles-liaisons conjuguées dans les différents microsomes. Chaque valeur est la moyenne \pm l'écart-type (1) de 2 expériences différentes.
n.d.: non déterminé (inférieur au seuil de détection).

3.7. DOSAGES DU FER ET DU ZINC MICROSOmaux.

Le fer est présent à une concentration élevée dans les microsomes hépatiques, principalement sous la forme de ferritine. Il est également relativement abondant dans les microsomes pulmonaires.

Les concentrations les plus importantes en zinc sont par contre retrouvées dans les microsomes pulmonaires.

	Fer (mg/g de protéines)	Zinc (µg/g de protéines)
Coeur	0,86 ± 0,13	58,5 ± 17,5
Foie	4,48 ± 0,77	113 ± 21,8
Reins	0,69 ± 0,11	76 ± 15,9
Poumons	1,35 ± 0,32	205 ± 28,1

Tableau 12: Concentrations en fer et zinc dans les différents microsomes. Chaque valeur est la moyenne ± l'écart-type de 10 expériences.

3.8. DOSAGE DE LA VITAMINE E MICROSOMALE.

La vitamine E est l'antioxydant biologique majeur des membranes lipidiques. Elle est présente à un taux relativement élevé dans les microsomes pulmonaires.

	Vit E (µmol/g de protéines)	Vit E/AGPI (µmol/µmol)
Coeur	48,34 ± 6,56	261,27 ± 41,3
Foie	30,76 ± 9,38	222,9 ± 55
Reins	17,9 ± 2,42	158 ± 13,4
Poumons	61,3 ± 6,34	502,4 ± 47,4

Tableau 13: Concentration en vitamine E et rapport vitamine E/AGPI dans les différents microsomes. Chaque valeur de vitamine E est la moyenne ± l'écart-type de 3 expériences différentes.

4. DISCUSSION DES RESULTATS

L'adriamycine est une drogue hautement cardiotoxique. En outre, son métabolisme au niveau microsomal est capable de générer des espèces radicalaires oxygénées (DOROSHOW, 1983). Il paraissait donc intéressant de savoir si le métabolisme de l'ADR au niveau des microsomes cardiaques présentait une particularité en relation avec la cardiotoxicité. C'est pourquoi dans ce travail, nous avons voulu comparer la susceptibilité de différents microsomes tissulaires (foie, coeur, reins, et poumons) de rats à la peroxydation induite par l'ADR.

La cardiotoxicité de l'ADR chez le rat est identique à celle observée chez l'homme, ce qui justifie l'utilisation de cet animal dans ce travail (METTLER et coll, 1977).

Les microsomes tissulaires constituent un modèle de choix pour l'étude in vitro de la peroxydation induite par les drogues red-ox cycling comme l'ADR. Ils possèdent en effet:

- L'activité enzymatique cytochrome P-450 réductase nécessaire à l'activation de l'ADR (KORNBRUST et coll, 1979).

- Des acides gras polyinsaturés, substrats de l'activité radicalaire, que nous avons nous-mêmes mesurés. L'évaluation de leur peroxydation peut être réalisée par les mesures des diènes conjugués, des hydroperoxydes, ou du MDA. C'est cette dernière méthode que nous avons choisie.

- Des enzymes impliquées à différents niveaux du métabolisme microsomal, et en particulier la Ca-ATPase riche en groupements thiols (SHERER et coll, 1986).

C'est la raison pour laquelle il nous a paru intéressant de suivre parallèlement à la peroxydation lipidique l'attaque radicalaire des protéines en mesurant la consommation des groupements thiols. Même si ce dosage ne reflète qu'une partie de la peroxydation protéique, il peut néanmoins apporter des renseignements sur l'état d'oxydation de cette structure.

L'adriamycine, en contact avec les microsomes tissulaires, génère des ERO et notamment le radical $^{\circ}\text{OH}$, tel que nous avons pu l'observer lors de l'étude par résonance paramagnétique électronique (RPE).

Tous les microsomes, à l'exception de ceux de poumons, sont peroxydables lorsqu'ils sont incubés en présence d'ADR.

L'intensité de la peroxydation lipidique est variable selon les tissus et selon la dose d'ADR employée. A cet égard, nous avons observé une production maximale de MDA dans les microsomes hépatiques (4 à 5 fois les taux du témoin sans ADR) pour une

concentration d'ADR de 25-50 μM . La peroxydation des microsomes cardiaques est aussi optimale à ces concentrations d'ADR, mais les quantités de MDA produit sont plus faibles. La peroxydation des microsomes rénaux est quant à elle maximale pour des doses 2 à 4 fois plus élevées en ADR (100 μM), tandis que les microsomes pulmonaires ne s'oxydent pas et apparaissent relativement bien protégés de la peroxydation induite par ce médicament.

La peroxydation des microsomes cardiaques est donc possible malgré de faibles teneurs en cytochrome P-450 réductase (15 fois moins que dans le foie). Le relatif déficit en cette enzyme pourrait être compensé par la plus grande richesse de ces organelles en AGPI, substrats de la peroxydation lipidique. De plus, le pourcentage en C22: 5 (acide docosopentaénoïque) et C22: 6 (acide docosahexaénoïque) est également plus élevé que dans les autres microsomes. Ces deux acides-gras étant extrêmement sensibles à l'attaque radicalaire, ils pourraient rendre compte d'une plus grande susceptibilité cardiaque à un faible stress oxydatif.

Aux fortes concentrations en ADR, on observe une diminution de la production de MDA dans tous les microsomes sensibles à la peroxydation; Ce phénomène est particulièrement important dans les microsomes hépatiques et rénaux. Il peut sembler paradoxal, mais il a déjà été rapporté dans d'autres études utilisant comme modèle les microsomes hépatiques de rats (MIMNAUGH et coll, 1981; HIDA, 1993). Il est néanmoins à interpréter avec prudence car d'autres dérivés de la peroxydation lipidique pourraient alors être générés dans ces conditions, soit en amont de la formation de MDA (diènes conjugués), soit à la place du MDA (4-hydroxynonéal ou autres aldéhydes non TBA-réactants).

Parallèlement à la peroxydation lipidique, nous avons également observé, dans tous les microsomes incubés avec l'ADR, à l'exception des microsomes pulmonaires, une consommation des groupements thiols protéiques. La courbe dose-réponse, contrairement à celle de production du MDA, atteint un plateau à partir d'une concentration variable selon les organes (50 μM pour les microsomes hépatiques et cardiaques, 100 μM pour les microsomes rénaux). Ces concentrations correspondent également au maximum de production de MDA dans ces mêmes microsomes. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que la consommation des groupements thiols et la production de MDA dans les microsomes sensibles à l'activation de l'ADR relèvent d'un processus oxydatif semblable.

Des résultats similaires aux nôtres sont retrouvés par VILE et coll. (1990) qui observent une consommation de l'ordre de 30% des groupements thiols dans des microsomes de coeurs de lapin incubés avec 30 μM d'ADR. Dans ce modèle, le pourcentage de thiols oxydés s'accompagne d'une inhibition de la recapture du Ca par le réticulum de l'ordre de 85%. Le maintien de l'intégrité des groupements thiols est nécessaire pour la

régulation de l'homéostasie calcique par la Ca-ATPase microsomale (THOR et coll, 1985; DI MONTE et coll, 1984). La consommation de ces groupements au niveau des microsomes cardiaques, pourrait expliquer la toxicité de l'ADR sur cet organe qui est particulièrement sensible aux variations de concentrations en calcium intracellulaire, puisque les cycles de contraction-relaxation en dépendent.

La peroxydation microsomale, lipidique ou protéique, requiert la présence de fer (VILE et coll, 1990). Au cours de ce travail, nous n'avons pas apporté de fer exogène au milieu réactionnel. Le fer nécessaire au déclenchement des réactions radicalaires est présent naturellement dans les préparations microsomales tel que nous avons pu le vérifier. Les microsomes hépatiques sont les plus riches en fer. A ce niveau, ce métal est principalement sous forme de ferritine: l'ADR peut mobiliser le fer de la ferritine, et peut également mobiliser le fer non-hémunique non-ferritique présent dans la membrane microsomale (MINOTTI et coll, 1991). Dans les réactions de peroxydation, les besoins en fer sont faibles. Cet élément a un rôle de catalyse. Il n'existe donc pas de parallélisme entre la quantité de fer présent dans le système microsomal et son rôle prooxydant.

La déféroxamine (DEFERAL[®]), un chélateur spécifique du fer, prévient presque complètement la consommation des groupements thiols de microsomes incubés avec l'ADR (VILE et coll, 1990). Elle inhibe également totalement la peroxydation lipidique de microsomes hépatiques en présence de 25 μ M d'ADR (HIDA, 1993). Ces résultats peuvent suggérer que le fer joue un rôle capital dans les processus de peroxydation lipidique et protéique induits par l'ADR.

Dans ce travail, nous avons évalué le statut en antioxydants physiologiques présents dans les milieux microsomaux.

Le zinc est un antioxydant biologique impliqué dans plusieurs processus charnières de la lutte antiradicalaire. Il protège les groupements thiols de l'oxydation, prévenant ainsi la formation de ponts disulfures ou de ponts inter-protéines (BRAY, 1990). Il entre également en compétition avec les métaux de transition comme le fer et prévient la réaction d'oxydation des acides gras insaturés catalysée par ce métal (MINOTTI et coll, 1987). Enfin le zinc pourrait protéger la membrane du processus oxydatif par ses propriétés de stabilisateur de membranes.

L'effet antioxydant du zinc a été rapporté *in vivo* dans d'autres conditions de stress oxydatif. En ce sens, le zinc diminue la peroxydation chez les rats intoxiqués par le tétrachlorure de carbone (CHVAPIL et coll, 1973). La carence en zinc chez le rat s'accompagne d'une augmentation des taux de MDA et du taux de diènes conjugués dans le muscle cardiaque (COUDRAY et coll, 1993).

Les microsomes pulmonaires sont particulièrement riches en zinc. Cette particularité peut expliquer la résistance de ses organelles à la peroxydation induite par l'ADR. Cette résistance pourrait également s'expliquer par leur relative richesse en vitamine E. La vitamine E est en effet l'antioxydant biologique majeur de la membrane lipidique. Dans ces microsomes, elle est présente à une concentration relativement élevée surtout lorsqu'elle est rapportée aux acides gras polyinsaturés qu'elle protège de la peroxydation (502 $\mu\text{mol Vit E}/\mu\text{mol d'AGPI}$ contre 261 $\mu\text{mol Vit E}/\mu\text{mol d'AGPI}$ dans les microsomes cardiaques). La prévention de la peroxydation lipidique *in vivo* et *in vitro* par la vitamine E a fait l'objet de nombreuses études (PALOZZA et coll, 1991; MYERS et coll, 1976). MIMNAUGH et coll (1981) rapportent que la vitamine E, présente à des taux élevés dans les microsomes cardiaques, protège ce système de la peroxydation induite par l'ADR, la peroxydation ne se produisant que chez les rats carencés en vitamine E. Ces résultats sont en contradiction avec les nôtres concernant cet organe où nous avons pu mettre en évidence un processus oxydatif. En outre, la concentration en vitamine E/AGPI que nous avons mesurée n'est que légèrement supérieure à celle retrouvée dans les microsomes hépatiques où nous avons également observé une peroxydation.

De manière indirecte, la vitamine E, en maintenant l'intégrité des membranes lipidiques soumises à un stress oxydatif, pourrait avoir un effet protecteur sur les protéines microsomaux (DEAN et coll, 1987).

Afin de mieux cerner les mécanismes de peroxydation et de compléter certaines études sur ce sujet, nous avons testé deux antioxydants dont la biodisponibilité n'est pas incompatible avec une protection *in vivo*.

L'acide 13-cis rétinolique, utilisé ici comme antioxydant liposoluble, protège les microsomes hépatiques et rénaux de la peroxydation induite par l'ADR, mais pas les microsomes cardiaques. L'A.R. pourrait agir dans ce modèle comme scavenger des radicaux peroxydes formés lors de la phase de propagation de la peroxydation lipidique. Des résultats similaires sont retrouvés par SAMORKYSZYN et coll. (1990) sur des microsomes hépatiques soumis à un autre stress oxydatif. Cependant, l'absence de protection des microsomes cardiaques par ce produit nous conduit à émettre plusieurs hypothèses:

- Il pourrait exister des différences de diffusion de l'A.R. dans les tissus et en particulier une mauvaise diffusion dans les microsomes cardiaques.
- Les radicaux peroxydes produits lors du stress oxydatif n'auraient pas tous la même affinité pour l'A.R.; ceux issus des microsomes cardiaques auraient une plus faible affinité envers ce produit et pourraient entretenir la réaction en chaîne de peroxydation.
- L'AR serait rapidement dégradé dans les microsomes cardiaques.

S'agissant de la N-acétylcystéine, DOROSHOW et coll. (1981) ont observé *in vivo* que l'administration de cet antioxydant diminue la mortalité et la cardiotoxicité associées à l'administration chronique d'ADR chez l'animal.

Dans notre étude *in vitro*, nous n'avons pas montré d'effet protecteur de la peroxydation lipidique avec ce produit. POWELL et coll.(1988), dans le même type d'expérience, n'observent une inhibition significative de la peroxydation lipidique que lorsqu'un facteur cytosolique thermolabile est ajouté au milieu réactionnel.

Nos résultats suggèrent que la NAC seule n'exerce pas d'effet scavenger de radicaux, notamment du radical hydroxyle, dans le système microsomal.

En conclusion, le processus peroxydatif induit par l'ADR dans les différents microsomes tissulaires semble relever de mécanismes complexes et dépendre fortement de la concentration en antioxydants physiologiques. La peroxydation des microsomes cardiaques, évaluée par le taux de MDA généré ainsi que par la consommation des groupements thiols, n'est pas plus importante que celle observée dans les microsomes hépatiques. Par l'évaluation de ces deux marqueurs, nous ne pouvons pas conclure à une susceptibilité particulière des microsomes cardiaques au stress oxydatif engendré par l'ADR.

Le modèle microsomal ne tient cependant pas compte des enzymes de la lutte antiradicalaire cellulaires puisque c'est un système isolé. Il est donc possible que *in vivo*, le coeur étant relativement pauvre en SOD, catalase, glutathion transférase, les microsomes cardiaques soient soumis à un stress oxydatif plus important que dans les autres tissus. D'autre-part, les conséquences de ces peroxydations pourraient être, *in vivo*, plus ou moins bien tolérée selon les tissus, mais l'utilisation d'un modèle microsomal isolé ne permet pas d'évaluer ce phénomène. Cela justifierait l'emploi d'autres modèles expérimentaux comme les cultures cellulaires ou les animaux de laboratoire.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'adriamycine est un cytotoxique capable de générer par plusieurs mécanismes des radicaux libres. Dans ce travail, nous avons confirmé que cette drogue, après activation par la cytochrome P-450 réductase microsomale, produit des espèces réactives oxygénées. Ces radicaux ont la capacité d'endommager les membranes microsomales par l'attaque de leurs composants lipidiques et protéiques. La peroxydation des microsomes cardiaques in vitro peut être un argument en faveur de la cardiotoxicité de l'adriamycine; ce processus n'est cependant pas spécifique à ce tissu. D'autres études sur des modèles cellulaires ou animaux in vivo, qui tiennent compte de l'environnement enzymatique et du métabolisme de la drogue, permettraient d'étudier de façon plus complète l'importance du processus.

Au delà de cette perspective, l'utilisation en clinique de l'adriamycine est toujours limitée par le risque de survenue d'une cardiotoxicité irréversible. L'emploi d'antioxydants adéquats, conjointement au traitement, pourrait peut-être sinon prévenir, tout au moins retarder le développement de cette toxicité. La solution idéale dans l'avenir serait d'employer l'adriamycine couplée à un anticorps monoclonal spécifique aux cellules tumorales. Ainsi, le potentiel cytotoxique de ce produit ne s'exercerait que sur les cellules malignes et épargnerait les tissus sains.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abdella B.R.J., Fischer J.: A chemical perspective on the anthracycline antitumour antibiotics. *Environ. Health Perspect.* 1985, **64**, 3-18.
- Akman S.A., Doroshov J.H., Burke T.G., Dizdaroglu M.: DNA base modifications induced in isolated human chromatin by NADH dehydrogenase-catalysed reduction of doxorubicin. *Biochemistry* 1992, **31**, 3500-3506.
- Anders R.J., Shanes J.G., Zeller F.P.: Lower incidence of doxorubicin-induced cardiomyopathy by once a week low-dose administration. *American Heart Journal* 1986, **111** (4), 755-759.
- Balanehru S., Nagarajan B.: Intervention of adriamycin induced free radical damage. *Biochemistry international* 1992, **28** (4), 735-744.
- Bartoszek A., Wolf C.R.: Enhancement of doxorubicin toxicity following activation by NADPH cytochrome-P450 reductase. *Biochem. Pharmacol.* 1992, **43** (7), 1449-1457.
- Bellamy W.T., Dalton W.S., Meltzer P., Dorr R.T.: Role of glutathione and its associated enzymes in multidrug-resistant human myeloma cells. *Biochem. Pharmacol.* 1989, **38**, 787-793.
- Benchekroun M.N., Catroux P., Montaudon D., Robert J.: Development of mechanisms of protection against oxidative stress in doxorubicin-resistant rat tumoral cells in culture. *Free Rad. Res. Comms.* 1990, **11** (1-3), 137-144.
- Bray T.M., Bettger W.: The physiological role of zinc as antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* 1990, **8**, 281-291.
- Brenner D.E., Grosh W.W., Noone R., Stein R., Greco F.A., Hande K.R.: Human plasma pharmacokinetics of doxorubicin: comparison of bolus and infusional administration. *Cancer Treat. Symp.* 1984, **3**, 77-83.
- Bristow M.R., Kantrowitz N.E., Harrison W.D., Minobe W.A., Sageman W.S., Billingham M.E.: Mediation of subacute anthracycline cardiotoxicity in rabbits by cardiac histamine release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1983, **5**, 913-919.
- Buc Calderon P., Praet M., Ruyschaert J.M., Roberfroid M.: Reduction of toxicity and increase antitumor effect of adriamycin by N-acyl dehydroalanines, a new family of free radical scavengers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990, **264**, 339-344.
- Cadet J., Weinfeld M.: Detecting DNA damage. *Analytical Chemistry* 1993, **65** (15), 675-682.
- Chao C.C.K., Huang Y.T., Ma C.M., Chou W.Y., Chao S.L.: Overexpression of glutathione S-transferase and elevation of thiol pools in a multidrug-resistant human colon cancer cell line. *Molecular Pharmacology* 1991, **41**, 69-75.
- Charcosset J.Y.: La résistance aux agents antitumoraux cytotoxiques. Dans Andrieu J.M. Biologie des cancers Editions Ellipses 1991, 163-174.
- Chvapil M., Ryan J.N., Elias S.L., Peng Y.M.: Protective effect of zinc on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Exp. Mol. Pharmacol.* 1973, **19**, 186-196.
- Coudray C., Charlon V., De Leiris J., Favier A.: Effect of zinc deficiency on lipid peroxidation status and infarct size in rat hearts. *Int. J. Cardiology* 1993, **41**, 109-113.

Crauste-Manciet S., Faure P., Madelaine I., Saulnier J.L.: Anticancéreux: utilisation pratique. Dossier du CNIMH, hors série 1992.

Cummings J., Smyth J.F.: Pharmacology of adriamycin: the message to the clinician. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* 1987, **24** (4), 579-582.

Cummings J., Anderson L., Willmott N., Smyth J.F.: The molecular pharmacology of Doxorubicin in vivo. *Eur. J. Cancer* 1991, **27** (5), 532-535.

Davies K.J.A.: Protein damage and degradation by oxygen radicals: general aspects. *J. Biol. Chem.* 1987, **262** (20), 9895-9901.

Davies K.J.A., Delsignore M.E., Lin S.W.: Protein damage and degradation by oxygen radicals: modification of amino acids. *J. Biol. Chem.* 1987, **262** (20), 9902-9907.

Davies K.J.A., Delsignore M.E.: Protein damage and degradation by oxygen radicals: modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 1987, **262** (20), 9908-9913.

Davies K.J.A., Lin S.W., Pacifici R.E.: Protein damage and degradation by oxygen radicals: degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* 1987, **262** (20), 9914-9920.

Dean R.T., Cheeseman K.H.: Vitamin E protects proteins against free radical damage in lipid environments. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* 1987, **148** (3), 1277-1282.

Del Maestro R.F., Thaw H.H., Bjork J., Planker M., Arfors K.: Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol. Scand.* 1980b, Supp; **492**, 43-57.

Demant E.J.F., Noerskov-Lauritsen N.: Binding of transferrin-iron by adriamycin at acidic pH. *Febs Lett.* 1986, **196**, 321-324.

Demant E.J.F.: Inactivation of cytochrome c oxidase activity in mitochondrial membranes during redox cycling of doxorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 1991, **41** (4), 543-552.

Di Monte D., Bellomo G., Thor H., Nicotera P., Orrenius S.: Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984, **235** (2), 343-350.

Doroshov J.H., Locker G.Y., Ifrim I., Myers C.E.: Prevention of doxorubicin cardiac toxicity by N-acetylcysteine. *J. Clin. Invest.* 1981, **65**, 128-135.

Doroshov J.H.: Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res.* 1983, **43**, 460-472.

Doroshov J.H.: Doxorubicin-induced cardiac toxicity. *N. Engl. J. Med.* 1991, **324** (12), 843-845.

Eliot H., Gianni L., Myers C.E.: Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex. *Biochemistry* 1984, **23**, 928-936.

Emerit J., Fehner J., Galli A., Clavel J.P., Congy F.: Les radicaux libres dérivés de l'oxygène et la peroxydation lipidique. Rôle en biologie et en physiopathologie. *Presse méd.* 1986, **15** (16), 751-754.

Espie M., Extra J.M., Marty M.: Pharmacologie anticancéreuse. In Schorderet M.: Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Frison-Roche 2^{éd} 1992.

Favier A.: Defence of the body against free radicals. Ecole d'été de formation à la biologie des radicaux libres. AUSSOIS 1992.

Fridovich I.: Biological aspect of superoxyde radical and superoxide dismutases. In Hayaishi O., Asada K.: Biochemical and medical aspect of active oxygen. *University Park Press* 1977, 171-181.

Fridovich I.: The biology of oxygen radical. *Science* 1978, **201**, 875-880.

Fry M., Green D.E.: Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 1981, **256**, 1874-1880.

Fu L.X., Waagstein F., Hjalmarson A.: A new insight into adriamycin-induced cardiotoxicity. *Int. J. of Cardiology* 1990, **29**, 15-20.

Gabit G.T., Barior B.M.: The oxygen forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1979, **254**, 9070-9074.

Geetha A., Shyamala Devi C.S.: Effect of doxorubicin on heart mitochondrial enzymes in rats: a protective role for alpha-tocopherol. *Indian J. Experimental Biology* 1992, **30**, 615-618.

Gianni L., Corden J., Myers C.E.: The biochemical basis of anthracycline toxicity and antitumor activity. *Rev. Biochem. Toxicol.* 1983, **5**, 1-82.

Goodman J., Hochstein P.: Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977, **77**, 797-803.

Green M.D., Speyer J.L., Muggia F.M.: Cardiotoxicity of anthracyclines. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1984, **20** (2), 293-296.

Griffin-Green E.A., Zaleska M.: Adriamycin induced lipid peroxidation in mitochondria and microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 1988, **37**, 3071-3077.

Gutteridge J.M.C.: Antioxidant properties of caeruloplasmin toward copper and iron dependant oxygen radical formation. *Febs Lett.* 1984, **172**, 245-249.

Halliwell B., Foyer C.H.: Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochem. J.* 1976, **155**, 697-700.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free radicals in biology and medicine. Second edition. Oxford University Press 1989.

Harris R.N., Doroshov J.H.: Effect of doxorubicin-enhanced hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation on calcium sequestration by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, **130**, 739-745.

Hasinoff B.B., Davey J.P.: Adriamycin and its iron(III) and copper(II) complexes. *Biochem. Pharmacol.* 1988, **37** (19), 3663-3669.

Hida H.: Anticancereux et especes reactives de l'oxygene. Etude de l'effet des antioxydants sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine. Mémoire du

DES de pharmacie hospitalière et des collectivités 1993. Université Joseph Fourier. Grenoble 1.

Jocelyn P.C.: Spectrophotometric assay of thiols. *Methods in enzymology* 1987, **143**, 44-67.

Keizer H.G., Pinedo H.M., Schuurhuis G.J., Joenje H.: Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmac. Ther.* 1990, **47**, 219-231.

Klaassen C.D., Plaa G.L.: Comparaison of the biological alteration elicited in liver from rats treated with carbon tetrachloric acid, chloroform, 1'1'2-trichloroethane and 1'1'1-trichloroethane. *Biochem. Pharmacol.* 1969, **15**, 374-384.

Kornbrust D.J., Mavis R.D.: Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: correlation with vitamin E content. *Lipids* 1979, **15** (5), 315-322.

Krinsky N.I.: Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Biol. Med.* 1989, **7**, 617-635.

Lee V., Randhawa A.K., Singal P.K.: Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *Am. J. Physiol.* 1991, **261**, 989-995.

Legha S.S., Wang Y.M., Mackay B., Ewer M., Hortobagyi G.N., Benjamin R.S., Ali M.K.: Clinical and pharmacologic investigation of the effects of α -tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Annals New-York Academy of Sciences* 1982, 411-416.

Lin T.J., Liu G.Y., Xu G.Z.: Protection by salvianolic acid A against adriamycin toxicity on rat heart mitochondria. *Free Rad; Biol. Med* 1992, **12**, 347-351.

Llesuy S.F., Milei J., Gonzalez Flecha B.S., Boveris A.: Myocardial damage induced by doxorubicins: Hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. *Free Rad. Biol. Med.* 1990, **8**, 259-264.

Lown W., Chen H., Plambeck J.A.: Further studies on the generation of reactivities oxygen species from activated anthracyclines and the relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects. *Biochem. Pharmacol.* 1982, **31** (4), 575-581.

Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.: *J. Biol. Chem.* 1951, **193**, 265-275.

Mettler F.P., Young D.M., Ward J.M.: Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res.* 1977, **37**, 2705-2713.

Mimnaugh E.G., Trush M.A., Gram T.E.: Stimulation by adriamycin of rat heart and liver microsomal NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 1981, **30** (20), 2797-2804.

Minotti G., Aust S.D.: The role of iron on the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 1987, **44**, 191-208.

Minotti G.: Adriamycin-dependent release of iron from microsomal membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989a, **268**, 398-403.

- Minotti G.: Reactions of adriamycin with microsomal iron and lipids. *Free Rad. Res. Comms.* 1989b, **7** (3-6), 143-148.
- Minotti G., Di Gennaro M., D'ugo D., Granone P.: Possible sources of iron for lipid peroxidation. *Free Rad. Res. Comms.* 1991, (12-13), 99-106.
- Monteiro H.P., Vile G.F., Winterbourn C.C.: Release of iron from ferritin by semiquinone, anthracycline, bipyridyl and nitroaromatic radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 1989, **6**, 587-591.
- Monti E., Paracchini L., Perletti G., Piccinini F.: Protective effects of spin-trapping agents on adriamycin-induced cardiotoxicity in isolated rat atria. *Free Rad. Res. Comms.* 1991, **14** (1), 41-45.
- Muindi J.R.F., Sinha B.K., Gianni L., Myers C.E.: Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex. *Febs Lett.* 1984, **172** (2), 226-230.
- Myers C.E., Mc Guire W., Young R.: Adriamycin: amelioration of toxicity by alpha-tocopherol. *Cancer Treatment Reports* 1976, **60** (7), 961-962.
- Odom A.L., Hatwig C.A., Stanley J.S., Benson A.M.: Biochemical determinants of adriamycin toxicity in mouse liver, heart, and intestine. *Biochem. Pharmacol.* 1992, **43** (4), 831-836.
- Olson R.D., Mushlin P.S.: Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *Faseb J.* 1990, **4**, 3076-3086.
- Palozza P., Krinsky N.I.: The inhibition of radical-initiated peroxidation of microsomal lipids by both alpha-tocopherol and beta-carotene. *Free Rad. Biol. Med.* 1991, **11**, 407-414.
- Paradies G., Ruggiero F.M.: The effect of doxorubicin on the transport of pyruvate in rat-heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* 1988, **156**, 1302-1307.
- Powis G.: Anthracycline metabolism and free radical formation. In *Metabolism and action of anticancer drugs*, Powis G. and Russel G.A. Eds Taylor & Francis, London, 1987, 211-260.
- Powis G.: Free radical formation by antitumor quinones. *Free Rad. Biol. Med.* 1989, **6**, 63-101.
- Powell S.R., Mc Cay P.B.: Inhibition of doxorubicin-initiated membrane damage by N-acetylcysteine: possible mediation by a thiol-dependent, cytosolic inhibitor of lipid peroxidation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1988, **96**, 175-184.
- Pritsos C.A., Sokoloff M., Gustafson D.L.: PZ-51 (Ebselen) in vivo protection against adriamycin-induced mouse cardiac and hepatic lipid peroxidation and toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 1992, **44** (4), 839-841.
- Ramu A., Cohen L., Glaubiger D.: Oxygen radical detoxification enzymes in doxorubicin-sensitive and -resistant P388 murine leukemia cells. *Cancer Res.* 1984, **44**, 1976-1980.
- Reddy C.C., Massaro E.T.: Biochemistry of selenium. A brief overview. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1983, **3**, 431-436.

Richard M.J., Guiraud P., Meo J., Favier A.: High performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials using a commercially available reagent. *J. Chromatogr.* 1992, **577**, 9-18.

Robert J.: Mécanismes moléculaires de la résistance aux médicaments anticancéreux. *Regard sur la biochimie* 1992, **1**: 35-43.

Samorkyszyn V.M., Marnett L.J.: Inhibition of liver microsomal lipid peroxidation by 13-cis retinoic acid. *Free Rad. Biol. Med.* 1990, **8**, 491-496.

Sato S., Iwaizumi M., Handa K., Tamura Y.: Electron spin resonance study on the mode of generation of free radicals of daunomycin, adriamycin and carboquone in NADPH microsomal system. *Gann* 1977, **68**, 603-608.

Scherer N.M., Deamer D.W.: Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca²⁺-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, **246**, 589-601.

Schisselbauer J.C., Crescimanno M., D'Alessandro N., Clapper M., Toulmond S., Tapiero H., Tew K.D.: Glutathione, glutathione S-transferases, and related redox enzymes in adriamycin-resistant cell lines with a multidrug resistant phenotype. *Cancer Comms.* 1989, **1** (2), 133-139.

Sinha B.K., Trush M.A., Kennedy K.A., Mimnaugh E.G.: Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA. *Cancer Res.* 1984, **44**, 2892-2896.

Sinha B.K., Mimnaugh E.G.: Free radicals and anticancer drug resistance: oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors. *Free Rad. Biol. Med.* 1990, **8**, 567-581.

Siu S.M., Draper H.H.: Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids* 1982, **17**, 349-355.

Thor H., Hartzell P., Svensson S.A., Orrenius S., Mirabelli F., Marinoni V., Bellomo G.: On the role of thiol groups in the inhibition of liver microsomal Ca²⁺ sequestration by toxic agents. *Biochem. Pharmacol.* 1985, **34** (20), 3717-3723.

Ursini F., Mairorino M., Gregolin C.: The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* 1985, **839**, 62-70.

Vile G.F., Winterbourn C.C.: Inhibition of adriamycin-promoted microsomal lipid peroxidation by β -carotene, alpha-tocopherol and retinol at high and low oxygen partial pressures. *Febs Letters* 1988a, **238**, 353-356.

Vile G.F., Winterbourn C.C.: Adriamycin-dependent peroxidation of rat liver and heart microsomes catalysed by iron chelates and ferritin. *Biochem. Pharmacol.* 1988b **37** (15), 2893-2897.

Vile G.F., Winterbourn C.C.: Thiol oxidation and inhibition of Ca-ATPase by adriamycin in rabbit heart microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 1990, **39** (4), 769-774.

Villani F., Galimberti M., Zunino F., Monti E., Rozza A., Lanza E., Favalli L., Poggi P.: Prevention of doxorubicin-induced cardiomyopathy by reduced glutathione. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1991, **28**, 365-369.

Williams C.H., Kamin H.: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.* 1962, **237** (2), 587-595.

Winterbourn C.C., Gutteridge J.M.C., Halliwell B.: Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. *J. Free Rad. Biol. Med.* 1985, **1**, 43-49.

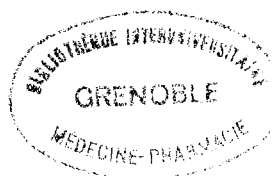
Winterbourn C.C., Vile G.F., Monteiro H.P.: Ferritin, lipid peroxidation and redox-cycling xenobiotics. *Free Rad. Res. Comms.* 1991, **12-13**, 107-114.



ABBREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADR: Adriamycine, Doxorubicine
ADR- SQ: Adriamycine Semiquinone
AGPI: Acides gras polyinsaturés
AR: Acide 13- cis rétinolique
CAT: Catalase
ERO: Espèces réactives oxygénées
GPX: Glutathion peroxydase
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
MDA: Malondialdehyde
NAC: N- acétylcystéine
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
°OH: Radical hydroxyle
RLO: Radicaux libres oxygénés
SOD: Superoxyde dismutase



CONCLUSIONS

Mémoire soutenu par M Theriot Jean-Yves.

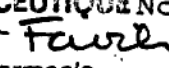
L'adriamycine est un cytotoxique capable de générer par plusieurs mécanismes des radicaux libres. Dans ce travail, nous avons confirmé que cette drogue, après activation par la cytochrome P-450 réductase microsomale, produit des espèces réactives oxygénées. Ces radicaux ont la capacité d'endommager les membranes microsomaux par l'attaque de leurs composants lipidiques et protéiques. La peroxydation des microsomes cardiaques in vitro peut être un argument en faveur de la cardiotoxicité de l'adriamycine; ce processus n'est cependant pas spécifique à ce tissu. D'autres études sur des modèles cellulaires ou animaux in vivo, qui tiennent compte de l'environnement enzymatique et du métabolisme de la drogue, permettraient d'étudier de façon plus complète l'importance du processus.

Au delà de cette perspective, l'utilisation en clinique de l'adriamycine est toujours limitée par le risque de survenue d'une cardiotoxicité irréversible. L'emploi d'antioxydants adéquats, conjointement au traitement, pourrait peut-être sinon prévenir, tout au moins retarder le développement de cette toxicité. La solution idéale dans l'avenir serait d'employer l'adriamycine couplée à un anticorps monoclonal spécifique aux cellules tumorales. Ainsi, le potentiel cytotoxique de ce produit ne s'exercerait que sur les cellules malignes et épargnerait les tissus sains.

Vu le Coordinateur du DES



P. D. LE NOC

Le Président du Jury
(Nom et signature)
Professeur Alain FAVIER 
Université J. Fourier - Faculté de Pharmacie
Domaine de la Merci
38700 LA TRONCHE-FRANCE
Tél. 76 51 80 00

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
J. FOURIER - GRENOBLE 1

A. NEMOZ 

Vu le Doyen de la Faculté de Pharmacie

Grenoble, le 11.02.1994


J. ROCHAT

NOM Prénom	THERIN Jean-Yves
TITRE DU MEMOIRE	Susceptibilité différentielle des microsomes tissulaires de rats à la peroxydation induite par l'Adriamycine:relation avec la cardiotoxicité
NATURE DU MEMOIRE	Mémoire de DES de Biologie Médicale tenant lieu de thèse de Docteur en Pharmacie. Grenoble 1994.
RESUME	<p>L'Adriamycine est un antinéoplasique dont l'utilisation en clinique est limitée par le risque de survenue d'une cardiotoxicité cumulative dose dépendante. Cette toxicité pourrait être en relation avec une susceptibilité particulière des fractions subcellulaires cardiaques aux effets délétères des espèces réactives oxygénées générées par l'Adriamycine.</p> <p>Dans ce travail, nous avons comparé la sensibilité à l'Adriamycine de différents microsomes tissulaires de rats, en mesurant les effets des attaques radicalaires des lipides et des protéines. Dans un second temps, après avoir évalué les effets de certains antioxydants, nous avons mesuré les statuts microsomaux en substrats antioxydants et prooxydants.</p> <p>Les microsomes cardiaques in vitro ne s'avèrent pas plus susceptibles que les microsomes hépatiques à la peroxydation induite par l'Adriamycine. Les études in vivo, tenant compte de l'environnement enzymatique et du métabolisme de la drogue, pourraient constituer un complément idéal à ce travail afin d'évaluer de façon plus complète l'importance du phénomène peroxydatif dans la cardiotoxicité de l'Adriamycine.</p>
MOTS CLES	Adriamycine-Microsomes tissulaires Cardiotoxicité- Radicaux libres- Peroxydation lipidique- Peroxydation protéique- Antioxydants-
JURY	<p>PRESIDENT Monsieur le Professeur A. FAVIER</p> <p>MEMBRES Monsieur le Professeur R. SCHAEERER Monsieur le Docteur C. COUDRAY Monsieur le Docteur P. FAURE</p>
DATE DE LA SOUTENANCE	15 Février 1994