



HAL
open science

Anticancéreux et espèces réactives de l'oxygène : étude de l'effet des antioxydants sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine

Hassan Hida

► **To cite this version:**

Hassan Hida. Anticancéreux et espèces réactives de l'oxygène : étude de l'effet des antioxydants sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine. Sciences pharmaceutiques. 1993. dumas-02483416

HAL Id: dumas-02483416

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02483416>

Submitted on 19 Feb 2020

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>

2^e exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER -GRENOBLE I-
U.F.R. DE PHARMACIE
Domaine de la Merci -LA TRONCHIE-

Année 1993

Mémoire n° 7040

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES

Présenté et soutenu publiquement

le 13 Octobre 1993

Par Monsieur Hassan HIDA

[Données à caractère personnel]

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

THIÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

ANTICANCEREUX ET ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE
Etude de l'effet des antioxydants sur la peroxydation microsomale
induite par l'Adriamycine



JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur A. FAVIER

MEMBRES

Monsieur le Professeur J. CALOP
Monsieur le Professeur F. LOCHER
Monsieur le Docteur C. COUDRAY
Madame le Docteur I. de BEAUCHAMP

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

Année 1993

Mémoire n°

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES**

Présenté et soutenu publiquement

le 13 Octobre 1993

Par Monsieur Hassan HIDA

[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**

**ANTICANCEREUX ET ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE
Etude de l'effet des antioxydants sur la peroxydation microsomale
induite par l'Adriamycine**

JURY

PRESIDENT Monsieur le Professeur A. FAVIER

MEMBRES Monsieur le Professeur J. CALOP
Monsieur le Professeur F. LOCHER
Monsieur le Docteur C. COUDRAY
Madame le Docteur I. de BEAUCHAMP

A la mémoire de mes parents

A ma famille.

A mes amis.

A Christelle.

A Monsieur le Professeur A. FAVIER, Président du jury ,

Nous connaissons son expérience et ses compétences.

Nous apprécions sa bonne humeur et ses qualités humaines.

Qu'il nous permette d'exprimer ici le témoignage de notre profonde gratitude et de notre grande admiration.

A Monsieur le Professeur J. CALOP,

Sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé.

Nous avons pu apprécier , au cours de notre internat, la qualité de son enseignement, sa rigueur, et son dynamisme.

Nous tenons à le remercier et à l'assurer de notre grand respect.

A Monsieur le Professeur F. LOCHER,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, qu'il en soit ici vivement remercié.

A Monsieur le Docteur C. COUDRAY,

Nous le remercions pour son aide précieuse.

Que ce travail demeure le témoignage de notre sincère amitié.

A Madame le Docteur I. de BEAUCHAMP,

Avec qui nous avons eu beaucoup de plaisir à travailler pendant notre internat.

Nous avons pu apprécier sa disponibilité et sa cordialité.

Qu'elle veuille accepter ici nos sincères remerciements.

Nous tenons à remercier les techniciennes du laboratoire de biochimie C, secteur des vitamines, pour leur aide et leur gentillesse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

GENERALITES SUR LA CHIMIOThERAPIE ANTICANCEREUSE

1. PRINCIPES GENERAUX

- 1.1. Cinétique cellulaire des cancers et des tissus normaux
- 1.2. Chimiothérapie et cycle cellulaire

2. MECANISMES GENERAUX D'ACTION DES CYTOSTATIQUES

- 2.1. Alkylation
- 2.2. Intercalation
- 2.3. Scission de L'ADN
- 2.4. Antimétabolites
- 2.5. Inhibition de la formation des tubulines
- 2.6. Inhibition de la topo-isomérase II
- 2.7. Génération de radicaux libres

3. TOXICITE DES ANTICANCEREUX

- 3.1. Toxicités communes
- 3.2. Toxicités particulières
 - 3.2.1. Toxicité hépatique
 - 3.2.2. Toxicité rénale
 - 3.2.3. Toxicité vésicale
 - 3.2.4. Toxicité pulmonaire
 - 3.2.5. Toxicité cardiaque
 - 3.2.6. Toxicité neurologique

LES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGENE

1. LA MOLECULE D'OXYGENE

2. DEFINITION DES RADICAUX LIBRES

3. LES DIFFERENTS TYPES DE RADICAUX LIBRES OXYGENES

- 3.1. L'anion superoxyde
- 3.2. Le peroxyde d'hydrogène
- 3.3. Le radical hydroxyle
- 3.4. L'oxygène singulet

4. PRODUCTION BIOLOGIQUE DES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGENE

5. DEVENIR DES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGENE

- 5.1. Altération des protéines
- 5.2. Altération des acides nucléiques
- 5.3. Peroxydation des lipides membranaires
 - 5.3.1. Mécanismes de la lipoperoxydation
 - 5.3.1.1. Initiation
 - 5.3.1.2. Propagation
 - 5.3.1.3. Terminaison
 - 5.3.2. Produits de la dégradation lipidiques
 - 5.3.2.1. Les diènes conjugués
 - 5.3.2.2. Les hydroperoxydes
 - 5.3.2.3. Les alcanes
 - 5.3.2.4. Le malondialdéhyde
 - 5.3.3. Quantification du phénomène de peroxydation lipidique

6. SYSTEMES DE DEFENSE NATURELLE CONTRE LES FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE

- 6.1. Systèmes antiradicalaires enzymatiques
 - 6.1.1. Les superoxydes dismutases
 - 6.1.2. La catalase
 - 6.1.3. Les glutathions peroxydases
- 6.2. Systèmes de défense non enzymatiques
 - 6.2.1. Les vitamines
 - 6.2.2. Autres molécules

ANTICANCEREUX ET RADICAUX LIBRES

1. INTRODUCTION

2. LES ANTHRACYCLINES

- 2.1. Anthracyclines et radicaux libres de l'oxygène
 - 2.1.1. Mécanismes de production radicalaire et les différents types de radicaux produits
 - 2.1.2. Anthracyclines et complexes métalliques
- 2.2. Rôle des radicaux oxygénés dans l'activité biologique des anthracyclines
 - 2.2.1. Dégradation de l'ADN
 - 2.2.2. Peroxydation lipidique
 - 2.2.3. Radicaux libres et résistance aux anthracyclines
 - 2.2.4. Cardiotoxicité des anthracyclines et radicaux libres

3. LA MITOXANTRONE

4. LA BLEOMYCINE

- 4.1. Bléomycine et radicaux libres
 - 4.1.1. Activation de la bléomycine-fer
 - 4.1.2. Radicaux libres et toxicité pulmonaire de la bléomycine

5. LA MITOMYCINE C

6. LE CELLIPTIUM

7. LE CYSPLATINE

8. L'ETOPOSIDE

PARTIE EXPERIMENTALE

1. INTRODUCTION

2. MATERIEL ET METHODES

- 2.1. Le modèle expérimental : les microsomes hépatiques
 - 2.1.1. Préparation des microsomes hépatiques de rat
- 2.2. Etude de la peroxydation microsomale induite par l'Adriamycine
 - 2.2.1. Techniques de dosages et conditions opératoires
 - 2.2.1.1. MDA
 - 2.2.1.2. HPO
 - 2.2.2. Choix des conditions opératoires (détermination de la concentration optimale en NADPH et en protéines microsomales)
 - 2.2.3. Etude de la peroxydation induite par l'adriamycine
- 2.3. Détection par RPE des formes actives de l'oxygène produites par l'adriamycine

2.4. Etude de l'effet des antioxydants sur la peroxydation induite par l'adriamycine

- 2.4.1. Effet des antioxydants sur la production de MDA
- 2.4.2. Effet des antioxydants sur la production des HPO

3. RESULTATS

3.1. Optimisation des conditions opératoires

- 3.1.1. Choix de la concentration en NADPH
- 3.1.2. Choix de la concentration en protéines microsomales

3.2. Etude de la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine

- 3.2.1. Production de MDA
- 3.2.2. Production des HPO

3.3. Détection par RPE des formes actives de l'oxygène produites dans les microsomes par l'adriamycine

3.4. Effet des antioxydants sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine

- 3.4.1. Effet de la SOD et de la catalase
 - 3.4.1.1. Sur la production de MDA
 - 3.4.1.2. Sur la production des HPO
- 3.4.2. Effet du zinc et du sélénium
- 3.4.3. Effet de l' α -tocophérol (la vitamine E) et du Glutathion
- 3.4.4. Effet du mannitol
- 3.4.5. Effet du Désferal

4. DISCUSSION DES RESULTATS

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La chimiothérapie occupe une place de choix dans le traitement des cancers. Malheureusement, son utilisation peut être limitée par la toxicité importante des produits employés jusqu'à présent. C'est pourquoi, depuis quelques années plusieurs voies de recherche sont ouvertes visant à résoudre ce problème et à améliorer le rapport tolérance / efficacité de ces produits.

Parmi ces axes de recherche, les liens entre les voies métaboliques de certains anticancéreux et la biochimie de l'oxygène ont suscité le plus grand intérêt. L'attention a notamment été focalisée sur les processus d'oxydation et en particulier la peroxydation des lipides membranaires .

Certaines drogues anticancéreuses, semblent en effet, être en mesure d'augmenter la production des espèces réactives de l'oxygène, ce qui affecte l'homéostasie cellulaire, et provoque des dégâts considérables à différents niveaux dans les cellules.

La compréhension des mécanismes des processus oxydatifs engendrés par les cytostatiques, suivie par l'évaluation de l'effet protecteur de certains antioxydants, pourraient à terme, permettre d'adjoindre aux antitumoraux des composés qui en optimiseraient l'action et en diminueraient la toxicité.

Les deux premières parties de ce travail sont consacrées à des rappels sur la chimiothérapie anticancéreuse et sur l'importance des radicaux libres en biologie.

Dans une troisième partie, sont discutés le rôle de la production des radicaux libres et des processus oxydatifs dans le mécanisme d'action cytotoxique et toxique de certains anticancéreux.

S'agissant des travaux personnels rapportés dans ce manuscrit, ils portent essentiellement sur la mise en évidence de la production de radicaux libres par l'adriamycine dans un système microsomal, ainsi que sur les lésions moléculaires engendrées par l'adriamycine (peroxydation lipidique) et l'effet de certains antioxydants sur ces lésions.

GENERALITES SUR LES ANTICANCEREUX

GENERALITES SUR LA CHIMIOETHERAPIE ANTICANCEREUSE

Le développement de la chimiothérapie anticancéreuse et l'emploi des agents cytostatiques ont commencé au début de la deuxième guerre mondiale, suite à une observation accidentelle de l'effet leucopéniant du gaz de combat.

Les premières chimiothérapies de la leucémie avec un antimétabolite, le méthotrexate, ont été publiées en 1948. Depuis, de nombreux produits synthétiques, ou obtenus par fermentation ou à partir des plantes, ont vu leur action antitumorale identifiée, et actuellement, une cinquantaine de molécules sont utilisées en cancérologie¹.

1. PRINCIPES GENERAUX.

1.1. Cinétique cellulaire des cancers et des tissus normaux.

La cellule eucaryote se dévise selon un cycle cellulaire qui comprend essentiellement deux périodes actives et une période de repos.

La période active se compose de 4 phases :

- Phase G1 : période post mitotique pendant laquelle les cellules synthétisent l'ARN messager et les éléments dont elles ont besoin.

- Phase S : période de synthèse des éléments nécessaires à la formation de deux cellules, notamment l'ADN.

- Phase G2 : période prémitotique avec poursuite de la synthèse de l'ARN et des protéines.

- Phase M : correspond au dédoublement des chromosomes qui se séparent le long des éléments du fuseau de scission en deux cellules (mitose) ².

Certaines cellules restent pendant une période très prolongée en G1 sans se diviser, mais en gardant la possibilité de rentrer dans le cycle et de se diviser à nouveau. Ce sont des cellules en G0 ou au repos.

Lorsqu'on a pu comparer directement la durée des différentes phases du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses et dans les cellules du tissu normal d'où est issue la tumeur, on a, en règle générale, observé un allongement de la phase S et du temps de génération dans les cellules tumorales.

¹Devita V.T. Principe du traitement du cancer. In : Harrisson T. R. Principes de médecine interne, Flammarion Médecine-Sciences éd., 1988, p. 1709-1725.

²Crauste -Manciet S., Faure P., Madelaine I., Saulnier J.L. Anticancéreux : utilisation pratique. Dossier du CNIMH, hors série, 1992.

Les stimuli initiaux de la prolifération cellulaire sont des hormones ou des facteurs de croissance qui, se liant à un récepteur cellulaire spécifique, provoquent une cascade d'événements intracellulaires qui transmettent au noyau le signal de prolifération (transduction du signal). Il existe deux familles de récepteurs : récepteurs à activité protéine Kinase et récepteurs associés aux protéines G (qui sont des protéines de régulation fixant le GTP). L'action sur le noyau se fera sur la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire. Outre ces signaux extra cellulaires, il existe des systèmes de contrôle intracellulaire, essentiellement du passage du point de restriction (point start qui contrôle le passage de G1/S) et de l'induction de la mitose (contrôle du passage G2/M).

1.2. Chimiothérapie et cycle cellulaire.

La cible des cytostatiques est la cellule tumorale, variable dans le temps selon sa position dans le cycle cellulaire, variable dans l'espace selon sa position au sein de la tumeur par rapport aux axes vasculaires, source d'oxygénation. L'effet des cytostatiques s'exprime essentiellement sur l'ADN des cellules tumorales (ou non) en prolifération. Le site d'action varie d'une drogue à l'autre, mais reste constant pour une drogue quelle que soit la population cellulaire et son rythme de prolifération³.

En fonction de leur action sur le cycle cellulaire, les anticancéreux peuvent être classés en trois principaux groupes.

*Médicaments cycle indépendants : assimilables à de véritables radiomimétiques, ils agissent sur toutes les populations cellulaires, dans ou hors du cycle.

*Médicaments cycle dépendants ; ils sont actifs sur toutes les cellules à condition que celles ci soient dans le cycle, ils sont actifs sur plusieurs phases du cycle.

* Médicaments phase dépendants : ils n'agissent que sur des cellules se trouvant à une phase donnée du cycle.

³Poullart P. (1991) Médicaments cytostatiques-cytolytiques. Pharmacologie et thérapeutique. La lettre du pharmacologue, 9(5), 314-330.

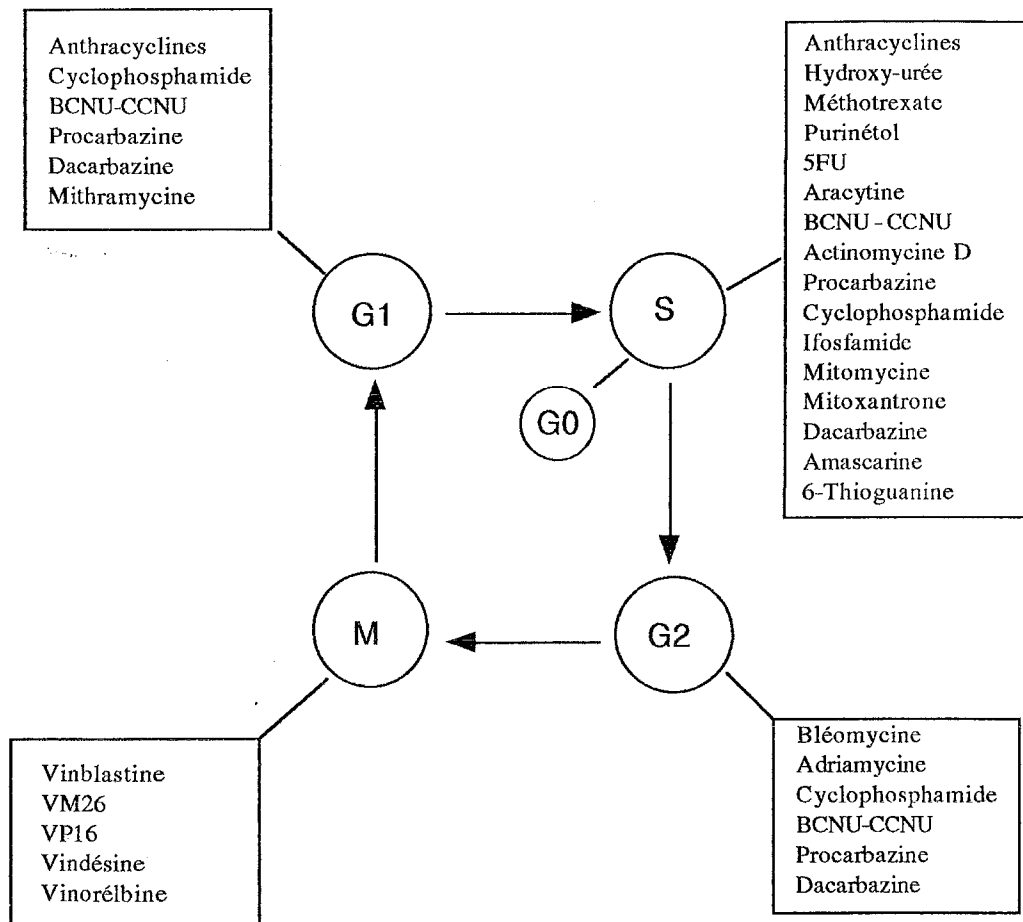


Figure 1 : Action des principaux cytostatiques au niveau du cycle cellulaire (2)

2. MECANISMES GENERAUX D'ACTION DES CYTOSTATIQUES.

Dans la majorité des cas, les agents anticancéreux exercent leur activité par l'intermédiaire d'une action directe ou indirecte sur l'acide désoxyribonucléique (l'ADN), d'une interaction avec l'acide ribonucléique (l'ARN) ou avec la synthèse des protéines.

2.1. Alkylation.

Il s'agit du remplacement par le produit alkylant d'un proton d'une structure nucléophile hautement réactive de l'ADN par un groupement alkyl ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$), formant ainsi une liaison covalente avec les acides nucléiques et créant sur l'ADN une cassure monocaténaire (Alkylant monofonctionnel) ou un pont intra ou intercaténaire (alkylation bifonctionnelle).

Les centres nucléophiles qui interagissent avec les alkylants sont situés sur les 3 bases : adénine, guanine, et cytosine. 90% de l'alkylation aurait lieu sur l'azote en 7 de la

guanine, et en proportion plus faible sur l'oxygène en 6⁴. Il en découle des pontages inter ou intracaténaires non réparables, rendant compte de l'effet cytotoxique de ces composés.

Bien que les principaux dommages provoqués par l'alkylation concernent l'ADN, il est certain que des lésions soient également produites au niveau des mitochondries, des membranes cellulaires, et du reticulum endoplasmique⁵.

Ce processus a un effet cytotoxique, mutagène et carcinogène.

Les agents alkylants sont actuellement subdivisés en plusieurs classes en fonction de leur structure chimique et leurs modalités d'action.

- Les moutardes de l'azote : il s'agit de La chlorméthine (CARYOLYSINE*), le melphalan (ALKERAN*), et le chlorambucil (CHLORAMINOPHENE*), utilisés depuis longtemps, mais n'ont conservé que des indications très limitées.

- Les oxazophorines : font parties des moutardes mais peuvent en être isolés par leurs propriétés pharmacologiques particulières. Ce groupe est composé du cylophosphamide, (ENDOXAN*) et l'ifosfamide (HOLOXAN*)

- Les éthylènes-imines : représentés par le thiotépa (THIOTEPA*) très peu utilisé et l'altrétamine (HEXASTAT*) dont l'utilisation est restreinte à cause de sa toxicité neurologique.

- Les sulfonyl-alcanes : dans ce groupe seul le busulfan (MISULBAN*), est utilisé.

- Les nitroso-urées : carmustine (BICNU*) lomustine (BELUSTINE*) et la streptozotocine (ZANOSAR*).

- Les triazènes et procarbazine: dacarbazine (DETICENE*) et procarbazine (NATULAN*).

- Les organoplatines : constitués de deux produits très utilisés : le cisplatine(CIS-PLATYL*) et le carboplatine (PARAPLATINE*).

- La mitomycine C : (AMETYCINE*).

2. 2. Intercalation.

C'est le passage d'une molécule polycyclique entre deux paires adjacentes de l'ADN, ce qui conduit à une inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN.

⁴Calop J., Carraz G. Anticancéreux et cancérogènes. In : Calop J., Carraz G. Pharmacodynamie spéciale, tome 4, Ellipses éd., 1988, p. 181-229.

⁵Marty M., Calvo F., Espie M., Lagier J.M., Florentin I., Giroud J.P. Médicaments anticancéreux. In Giroud J.P., Mathé G., Meyniel G. Pharmacologie clinique : bases thérapeutiques. Expansion Scientifique Française, 2 éd, 1988, p. 1894-1945.

Cette propriété ne rend que partiellement compte des effets cytotoxiques des agents considérés : l'intercalation est moins importante qu'avec d'autres molécules non cytotoxiques et, elle est inconstante. La formation d'un complexe ternaire médicament-enzyme-ADN avec la topoisomérase II est un élément essentiel à l'activité des intercalants⁶.

Dans ce groupe, on trouve 5 familles de molécules.

- Les anthracyclines : doxorubicine ou adriamycine (ADRIBLASTINE*), daunorubicine (CERUBIDINE*), épirubicine (FARMORUBICINE*), zorubicine (RUBIDAZONE*), aclarubicine (ACLACYNOMYCINE*), et pirarubicine (THEPRUBICINE*).

- Les amino-anthraquinones ou anthracènediones : dans ce groupe structurellement proche des anthracyclines, seule la mitoxantrone (NOVANTRONE*) est disponible.

- Anthracène-dicarboxaldéhydes : représentés par le bisanthrène (ZANTRENE*) qui partage avec les anthracyclines et les anthracènediones le noyau anthracène mais sans la fonction quinone.

- Les elliptiques : l'acétate d'elliptinium (CELLIPTIUM*) est la seule elliptique disponible en thérapeutique.

- Les actinomycines : dactinomycine (LYOVAC*).

2.3. Scission de l'ADN.

Certains agent cytotoxiques forment des complexes stables avec l'ADN, responsables de cassures de celui-ci. Ce mode d'action est caractéristique de la bléomycine (BLEOMYCINE*).

C'est un complexe glycopeptidique dont la bleomycine A2 est l'élément essentiel, elle se fixe par l'intermédiaire de son composant protéique sur l'ADN et provoque des cassures simples et doubles brins. L'action de la bléomycine ne s'exerce pas sur l'ARN et elle est spécifique de la phase G2 du cycle cellulaire.

2.4. Antimétabolites.

Ils inhibent une ou plusieurs étapes de la synthèse des acides nucléiques. Ce sont des molécules dont la formule chimique présente des ressemblances plus ou moins étroites avec celles de coenzymes ou métabolites nécessaires à ces synthèses. Ils en diffèrent néanmoins suffisamment pour agir en tant qu'inhibiteurs compétitifs dans les processus métaboliques.

⁶ Espie M., Extra J.M., Marty M. Pharmacologie anticancéreuse. In : . Schorderet M. Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Frison -Roche 2éd, 1992, p. 795-819.



Ils sont actifs essentiellement pendant la phase de synthèse de l'ADN. Trois catégories peuvent être identifiées :

- Les antifoliques : méthotrexate (LEDERTREXATE*).
- Analogues des pyrimidines : le fluoro-uracil ou 5-FU (FLUOROURACILE*) et la cytarabine ou cytosine arabinoside (ARACYTINE*, CYTARABEL*).
- Analogues des purines : la mercaptopurine ou 6-MP (PURINETHOL*) est un analogue structural de l'adénine et la thioguanine ou 6 TG (LANVIS*).

2.5. Inhibition de la formation des tubulines.

- Alcaloïdes de la pervenche : sous cette dénomination sont regroupées quatre molécules qui sont, la vinblastine (VELBE*), la vincristine (ONCOVIN*), la vindésine (ELDESINE*), et la vinoréline (NAVELBINE*). Les deux premiers sont des produits naturels. Les deux autres sont obtenus par hémisynthèse. Ils exercent leur activité en se fixant à la tubuline.

- Les épipodophylotoxines : ce sont des dérivés hémisynthétiques des podophylotoxines, substance naturelle isolée de *Podophyllum peltatum* : l'étoposide ou VP16 (VEPESID*), le téniposide ou VM26 (VEHEM*).

Quoique agents tubulo-affins, ces produits n'inhibent pas l'assemblage des microtubules et ne sont donc pas de véritables antimitotiques. Ils induisent un retard de la progression en phase S et un arrêt en fin de phase S ou au début de la phase G2.

2.6. Inhibition de la topo-isomérase II.

La topo-isomérase est une enzyme constituée d'une protéine dimérique nucléaire, et située stratégiquement sur les boucles de l'ADN. Elle permet la réplication de l'ADN, la transcription du gène et la séparation des chromosomes filles. Son taux est élevé dans les cellules à prolifération rapide⁷.

Certains cytostatiques sont capables de se lier irréversiblement avec la topoisomérase II et d'inhiber la réparation des cassures d'ADN effectuées par celle-ci. Ce sont les anthracyclines, les acridines (représentés en thérapeutique par l'amascarine AMSIDINE*), le mitoxantrone, l'ellipticine et les épipodophylotoxines (étoposide et téniposide).

⁷Clavel M. (1991) Chimiothérapies anticancéreuses, classification et mode d'action. Rev. Prat., 41(26), 2759-2766.

2.7. Génération de radicaux libres.

Plusieurs agents cytostatiques génèrent des espèces réactives de l'oxygène par des mécanismes variés et provoquent des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN, des protéines ou des membranes lipidiques. Nous y reviendrons dans un chapitre consacré à ce sujet.

3. TOXICITE DES ANTICANCEREUX.

L'absence de spécificité des médicaments anticancéreux sur les cellules cancéreuses rend compte de la fréquence des manifestations toxiques et des accidents qui surviennent au cours des traitements. On peut distinguer des toxicités communes à la quasi-totalité des anticancéreux, et d'autres propres à certaines drogues, d'apparitions généralement tardives et liées à des modes d'actions particuliers.

3.1. Toxicités communes.

- Dépression de la moelle osseuse : on l'observe avec la quasi-totalité des agents sauf l'asparaginase, la vincristine et la bléomycine. Avec la majorité des agents, la leucopénie est plus prononcée que la thrombopénie, sauf pour la mitomycine. L'anémie est généralement plus tardive.
- Lésions des muqueuses : qui peuvent s'étendre à tout le tube digestif (en particulier avec le méthotrexate, les anthracyclines, le 5-FU, et la dactinomycine)
- L'alopecie : constatée surtout avec le cyclophosphamide, la vincristine et l'adriamycine.
- Les nausées et les vomissements : observés avec tous les anticancéreux, et en particulier avec la chlorméthine, la dacarbazine, le cyclophosphamide, les nitroso-urées et les dérivés du platine.
- L'atteinte des cellules germinales : observée surtout avec les agents alkylants.

3.2. Toxicités particulières.

3.2.1. Toxicité hépatique.

La majorité des agents cytostatiques a été accusée d'une toxicité hépatique, mais le plus souvent, il s'agit d'observations isolées d'élévation transitoire du taux de certaines enzymes, où la relation cause à effet n'est pas clairement établie.

Cette toxicité est néanmoins prouvée pour des agents tels que la chlorméthine, le méthotrexate, l'aracytine, les anthracyclines, la dacarbazine, les nitroso-urées et la mythramycine. Les atteintes hépatiques observées peuvent aller de la simple élévation

transitoire des transaminases, à des foyers de nécrose cellulaire et à la cirrhose hépatique, en fonction de la durée du traitement et l'état de la fonction hépatique du patient avant la chimiothérapie.

3.2.2. Toxicité rénale

Elle occupe une place importante dans la chimiothérapie anticancéreuse, et peut mettre en jeu le pronostic vital.

Les médicaments les plus souvent responsables de cette toxicité sont le cis-platine, le cyclophosphamide, les nitroso-urées et le methotrèxate.

La toxicité rénale du cis-platine est particulièrement importante puisqu'elle survient chez 50 à 70% des patients traités. Elle est dose limitante et cumulative⁸. Histologiquement, elle se manifeste par une dégénérescence et une nécrose tubulaire focale sur les tubes distaux et collecteurs, et l'atteinte rénale est alors irréversible.

Le carboplatine, analogue structurale du cis-platine, présente une toxicité rénale moins importante⁹.

La mitomycine C peut être à l'origine d'insuffisance rénale grave, dose dépendante, et qui survient dans des délais imprévisibles. Elle est caractérisée par une dégénérescence des noyaux des glomérules et un épaississement de la membrane basale. La toxicité liée à la mitomycine C survient dans 8% des cas en monothérapie et dans 25% des cas en polychimiothérapie⁸.

Le méthothrexate aux fortes doses est à l'origine de tubulopathies et d'insuffisance rénale.

Les nitroso-urées et en particulier la streptozotocine provoquent des atteintes rénales (25% des malades traités) caractérisées par une atrophie rénale focale évoluant vers une insuffisance rénale chronique.

3.2.3. Toxicité vésicale.

Le cyclophosphamide et l'ifosphamide entraînent une nécrose tubulaire aiguë, mais l'effet secondaire majeur de ces produits est la cystite hémorragique. Elle est dose dépendante et peut aboutir à une fibrose de la vessie. L'incidence de cet effet pour le cyclophosphamide est de 78% avec 4% de mortalité¹⁰.

3.2.4. Toxicité pulmonaire.

⁸Piettre D. (1990) Classification clinique des anticancéreux à partir de leurs effets indésirables. La Pharmacie hospitalière française, 94, 1379-1396.

⁹Rose W.C., Scuring J.E. (1985) Preclinical antitumor and toxicologic profil of carboplatin. Canc. Treat. Rev., 12 (suppl A), 1-20.

¹⁰Fraisier L.H., Kanekal S., Kehrerj.P. (1991) Cyclophosphamide toxicity, charaterising and avoiding the problem. Drugs, 42 (5), 781-795.

Il s'agit essentiellement de la bléomycine, quand la dose cumulée est supérieure à 200 mg/m². Elle débute comme une pneumopathie et évolue de façon irréversible vers la fibrose interstitielle et intra-alvéolaire¹¹.

Des atteintes pulmonaires peuvent aussi être observées avec le busulfan, et avec d'autres agents alkylants. Le même tableau clinique et anatomopathologique que pour la bléomycine a été décrit pour le cyclophosphamide (1%)¹⁰, le chlorambucil, le melphalan et la mitomycine.

3.2.5. Toxicité cardiaque

Elle concerne quasi-exclusivement les anthracyclines (à des degrés différents selon la molécule), et correspond à deux tableaux cliniques différents : un type aigu, précoce spontanément réversible, caractérisé par des anomalies électrocardiographiques (modification des ST et T) et des arythmies; un type, tardif, dose cumulatif, se présente comme une insuffisance congestive pouvant entraîner une décompensation cardiaque irréversible. Bien que cette cardiomyopathie n'atteigne que 3% des malades recevant une dose d'adriamycine < à 500 mg/m², sa fréquence augmente considérablement (35%) au dessus de 550 mg/m². Cette toxicité est variable en fonction de l'anthracycline. Elle est, en effet, plus marquée pour l'adriamycine que pour l'épirubicine ou la pirarubicine. Le mitoxantrone, molécule structurellement proche des anthracyclines, présente une cardiotoxicité moins importante (< 5%). Le bisantène a une tolérance cardiaque satisfaisante¹².

Quelques observations isolées d'atteintes cardiaques ont été rapportées pour le cyclophosphamide à forte dose, ainsi que pour les alcaloïdes de la pervenche¹³.

3.2.6. Toxicité neurologique

La vincristine est le seul agent cancérostatique pour lequel la toxicité neurologique est parfaitement documentée et constitue un facteur limitatif du traitement. L'atteinte neurologique est caractérisée par des paresthésies, disparition des réflexes achilliens puis rotuliens. Elle évolue ensuite vers un stade majeur irréversible de polynévrites des membres inférieurs puis supérieurs.

Les autres médicaments rapportés neurotoxiques sont le 5-FU, le méthotrexate, (intratechal), la mithramycine, la cytarabine et la procarbazine⁸.

¹¹ Mugia F.M., Louie A.C., Sikic B.I. (1983) Pulmonary toxicity of antitumor agents. Cancer. Treat. Rev., 10, 221-243.

¹² Lacroix J., Jousselin T., Lacroix R. (1988) Vers une chimiothérapie plus efficace et mieux tolérée. pharm. Hosp., 94, 35-41.

¹³ Aymard J.P., Ferry R., Netter P., Ballaud A., Streif F. (1985) Toxicité cardiaque des alcaloïdes de la pervenche, étude critique de la littérature. Thérapie, 40, 361-364.

LES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGENE

LES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGENE

1. LA MOLECULE D'OXYGENE.

L'oxygène moléculaire ou oxygène diatomique O₂ est triple dans son état fondamental, possédant deux électrons non appariés sur ses orbitales externes. Il est paramagnétique et ne peut réagir avec des molécules diamagnétiques sans lever l'interdiction de spin. De ce fait l'oxygène moléculaire est une molécule peu réactive ¹⁴.

Sa conversion en une molécule réactive sous forme de singulet exige un changement de spin d'un électron célibataire ou une fragilisation de la liaison O-O. Cette conversion peut être obtenue dans les systèmes biologiques soit par des réactions photosensibilisées, -le sensibilisateur étant un état électronique excité qui transfère de l'énergie à l'oxygène-, soit par des réactions d'excitations chimiques ou enzymatiques qui n'impliquent pas d'excitations lumineuses.

2. DEFINITION DES RADICAUX LIBRES.

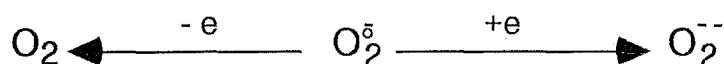
Dans un composé stable, les électrons sont tous appariés deux à deux; un radical libre peut se définir comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un électron non apparié sur l'orbitale externe ¹⁵.

Ce sont donc des corps instables, de durée de vie très courte (10⁻⁴ secondes), et présentant une extrême réactivité. En effet, s'ils ne sont pas éliminés rapidement, ils vont réagir immédiatement avec les molécules environnantes afin de réappairier leur électron célibataire et se stabiliser.

3. LES DIFFERENTS TYPES DE RADICAUX LIBRES OXYGENES

3.1. L'anion superoxyde ou le radical superoxyde : O₂^{o-}.

Il résulte de l'acceptation par une molécule d'oxygène à l'état fondamental d'un électron. Comme l'oxygène, l'anion superoxyde est paramagnétique et relativement peu réactif. C'est un oxydant ou un réducteur et il participe à des transferts d'électrons ¹⁶:



¹⁴Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases : an overview. In : Methods in ENZYMOLOGY, Vol 186. Academic press, New York, 1990. : p. 1-85.

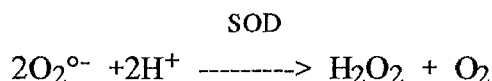
¹⁵Emerit J., Fechner J., Galli A., Clavel J.P., Congy F. (1986) Les radicaux libres dérivés de l'oxygène et la peroxydation lipidique. Rôle en biologie et en physiopathologie. Presse méd., 15 (16), 751-754.

¹⁶Clark J.M. (1974) The toxicity of oxygen. Am. Rev. Resp. Dis., 110, 40-50.

3.2. Le peroxyde d'hydrogène : H₂O₂.

La réduction à un électron du radical superoxyde donne de l'O₂⁻ qui n'a plus d'électrons non appariés et n'est donc plus un radical. En milieu protique, tout O₂⁻ formé va immédiatement donner le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Dans les milieux biologiques, l'anion superoxyde subit une dismutation pour former l'H₂O₂ et l'oxygène moléculaire; cette réaction, catalysée par la superoxyde dismutase, est considérée comme une défense naturelle contre la toxicité de l'O₂⁻.

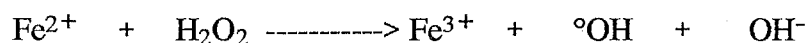


Le peroxyde d'hydrogène n'est pas lui même un radical, mais va pouvoir produire, par réduction, le radical hydroxyle.

3.3. Le radical hydroxyle : OH[°].

La fission homolytique de la liaison O-O de l'H₂O₂ conduit à la production de deux radicaux hydroxyle [°]OH. L'homolyse peut s'effectuer par la chaleur ou des radiations ionisantes.

En présence de fer, le peroxyde d'hydrogène peut produire le radical hydroxyle par une suite de réactions non enzymatique appelée réaction de FENTON.



Le radical hydroxyle est l'une des espèces chimiques les plus réactives connues.

Son pouvoir oxydant très puissant lui permet de réagir avec pratiquement tous les substrats organiques (aminoacides, sucres, phospholipides, bases puriques et pyrimidiques de l'ADN), par arrachement d'un atome d'hydrogène ou par transfert de l'électron célibataire.

3.4. L'oxygène singulet : ¹O₂¹⁷.

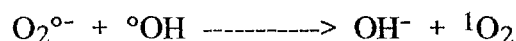
L'oxygène singulet est formé par la dismutation spontanée des anions superoxydes selon les réactions suivantes :

Dismutation spontanée :

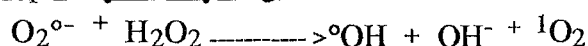


¹⁷Enrique C. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. Annu. Rev. Biochem., 58, 79-10.

Interaction avec °OH :



Interaction avec le peroxyde d'hydrogène :

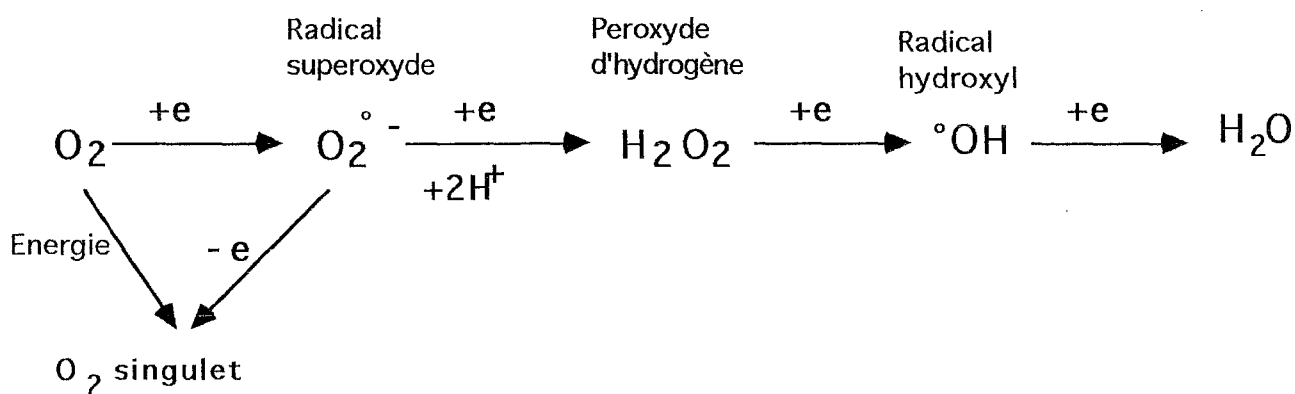


Il existe des situations pathologiques qui pourraient conduire aussi à la production massive de l'oxygène singulet.

4. PRODUCTION BIOLOGIQUE DES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGENE.

Les espèces réactives de l'oxygène résultent d'une réduction univalente ou divalente de l'oxygène moléculaire. Différents systèmes enzymatiques sont impliqués dans ce processus. Actuellement il y a environ 200 enzymes connues pour avoir l'oxygène moléculaire comme substrat, les réactions qu'elles catalysent donnent lieu soit à l'anion superoxyde, soit au peroxyde d'hydrogène¹⁸.

La réaction médiée par la cytochrome oxydase, au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale, permet la transformation de l'oxygène en eau par incorporation successive de 4 électrons. C'est la voie dite tétravalente qui représente plus de 95% de l'oxygène consommé dans les cellules vivantes. Cependant, dans le métabolisme mitochondrial normal d'une cellule, environ 5% de l'oxygène suit la voie de réduction uni ou divalente¹⁹.

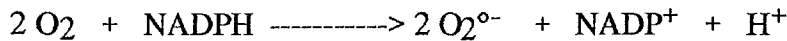


¹⁸Koukay N. Rôle du zinc et du sélénium dans la génération des radicaux libres lors des accidents ischémiques du myocarde. Thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier. Grenoble I, 1989.

¹⁹Fridovich I. (1978) The biology of oxygen radical. Science, 201, 875-880.

L'apport du premier électron est sous l'effet de diverses réactions enzymatiques cellulaires :

- La NADPH oxydase des polynucléaires : l'accélération du métabolisme oxydatif par divers facteurs (phagocytose, endotoxines, ...) aboutit à une flambée respiratoire (respiratory burst), associée à la production de formes oxygénées actives par l'intermédiaire de la NADPH oxydase ²⁰



- La xanthine oxydase : elle produit in vitro des quantités importantes de superoxyde quand elle réagit en présence de l'oxygène sur certains substrats (aldéhydes, purines.....). Par ce mécanisme, elle serait impliquée dans la pathogenèse des lésions post ischémiques ²¹.

- Radicaux libres issus du métabolisme des xénobiotiques : au cours de leurs métabolismes, certaines substances peuvent être transformées directement en structures radicalaires actives, ou générer des électrons qui interfèrent avec le métabolisme de l'oxygène.

Le tableau I regroupe les différentes sources des radicaux oxygénés en biologie.

²⁰Gabit G.T., Barior B.M. (1979) The oxygen forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. J. Biol. Chem., 254, 9070-9074.

²¹Hearse D.J., Manning A.S., Downey T.M., Yellon D.M. (1986) Xanthine oxidase : A critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion. Acta. Physio. Scand., 548 (suppl.), 75-78.

Tableau I : Différentes sources de radicaux oxygénés 15.

<i>Réactions d'auto-oxydation</i>
Flavines (FADH ₂ , FMNH ₂)
Quinones
Hémoglobine
Mélanine
Les groupements thiols
Tétrahydroptéridines
<i>Réactions enzymatiques</i>
Aldéhydes oxydases
NADPH Cytochrome P-450 réductase
NADPH oxydase
Sulfite oxydase
Xanthine oxydase
Lipooxygénase
Tryptophane dioxygénase
Glycolate oxydase
Férédoxine (P-430)
<i>Origines cellulaires</i>
Chaînes respiratoires mitochondriales et microsomales
Leucocytes et macrophages lors de la phagocytose
L'agrégation plaquettaire
Les cellules endothéliales
<i>Facteurs environnementaux</i>
Ultrats violets
Ultrasons
Radiations ionisantes
Ions métalliques
Xénobiotiques

5. DEVENIR DES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGÈNE.

Outre l'interconversion chimique selon les réactions de Fenton et de Haber Weiss, plusieurs réactions enzymatiques interviennent dans la transformation des formes actives de l'oxygène, mettant en jeu plusieurs types d'enzymes (SOD, peroxydases, catalases...). Ces formes actives de l'oxygène peuvent aussi être captées par des "oxygènes scavengers" tels que les vitamines C, E, et les caroténoïdes.

Cependant, les radicaux libres de l'oxygène peuvent engendrer des effets tissulaires toxiques dès que les systèmes régulateurs de protection sont dépassés; ceci par hyperproduction endogène (inflammation), hyperproduction exogène (radiations, médicaments), ou par diminution des systèmes de défense. Ces effets toxiques peuvent s'exercer aussi bien sur les acides nucléiques (mutagenèse, altération de la synthèse protéique,...) que sur les polysaccharides et les protéines (altération du collagène, du tissu élastique, des fonctions enzymatiques,...) ou encore sur les lipides, qui constituent la cible la plus fréquemment citée dans la littérature (altérations membranaires, accumulation de lipopigments).

5.1. Altération des protéines.

Elle est due essentiellement au radical hydroxyle (le radical superoxyde étant sans effet). Ce dernier attaque les chaînes peptidiques au niveau d'un carbone α , conduisant à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leurs fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées²².

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH)²³. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines qui constituent le tissu conjonctif de soutien (collagène) sont également sensibles aux attaques radicalaires. La conséquence étant une fibrose et une sclérose du tissu de soutien qui perd sa trophicité. Enfin, les protéines modifiées par oxydation deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases.

²²Favier A. Interêt des marqueurs de la peroxydation lipidique. Comptes rendus des XIIIèmes journées nationales de biologie. Lyon, le 26-27 Janv. 1990, 45-53.

²³Slater T.F. (1984) Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.*, 222, 1-15.

5.2. Altération des acides nucléiques.

La molécule ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires. Les modifications observées après action du radical OH° sont la conversion des résidus thymines en thymine glycol et en 5-hydroxyméthyluracile, et la guanine en 8-hydroxyguanine²⁴, entraînant des ruptures des brins. Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication et la synthèse des protéines.

5.3. Peroxydation des lipides membranaires.

L'oxydation des lipides alimentaires est connue depuis longtemps : modification de l'odeur, de la sapidité et des qualités nutritives. De même, les lipides des organismes vivants sont particulièrement sensibles à l'oxydation, et surtout ceux qui constituent les membranes cellulaires (acides gras polyinsaturés).

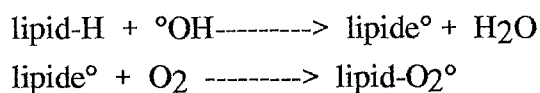
Les formes les plus réactives de l'oxygène peuvent initier directement la peroxydation lipidique : l'oxygène singulet attaque les systèmes d'électrons p, le radical hydroxyle attaque la plupart des composés organiques²⁵.

5.3.1. Mécanisme de la lipoperoxydation

5.3.1.1. Initiation.

La peroxydation est initiée par l'arrachement d'un atome d'hydrogène au niveau du groupement méthylène de la molécule lipidique suite à l'attaque d'une espèce radicalaire suffisamment réactive.

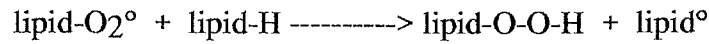
L'hydrogène a un seul électron, cela laisse un électron célibataire sur l'atome de carbone qui va chercher à se stabiliser par des réarrangements moléculaires internes, donnant des diènes conjugués, qui vont réagir avec l'oxygène moléculaire pour donner le radical péroxyle (lipide- O_2°) selon la réaction suivante :²⁷



Ce radical formé, étant instable, va extraire un atome d'hydrogène d'une autre molécule de lipide pour donner des hydroperoxydes (ROOH).

²⁴Kasai H., Nishimura S. (1986) Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical forming agents. *Environ. Health. Perspect.*, 67, 111-117

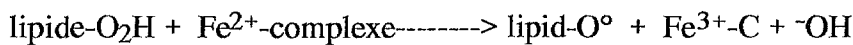
²⁵Gutteridge J.M.C., Halliwell B. (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, 15 (4), 129-135.



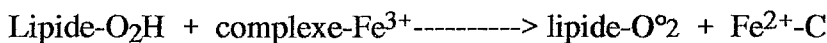
5.3.1.2. Propagation.

Les hydroperoxydes lipidiques sont relativement stables, aux températures physiologiques. Néanmoins, les métaux de transition peuvent catalyser leur décomposition et contribuer à la propagation de la peroxydation lipidique dans la membrane.

Les complexes de fer ferreux réagissent avec les hydroperoxydes (lipide-O₂H) pour donner des radicaux alkoxydes (Lipide-O°).



Avec un complexe Fe³⁺ le radical peroxyde peut être formé comme suit :



Les radicaux alkoxydes et peroxydes stimulent la réaction de peroxydation lipidique en chaîne, en arrachant d'autres atomes d'hydrogène à d'autres molécules lipidiques²⁴.

Au cours du processus de la peroxydation lipidique, l'abstraction d'un atome d'hydrogène au groupement méthylène situé entre les doubles liaisons en cis, est thermodynamiquement favorable par rapport aux autres parties de la chaîne; cela explique la susceptibilité particulière des acides gras polyinsaturés à la peroxydation²⁶.

Les hydroperoxydes au cours de ce processus peuvent évoluer de différentes façons :

- dégradation en différents produits et particulièrement en aldéhydes tels que le malondialdéhyde ou le 4-hydroxynonéal.
- conversion en RO° (en présence de fer) et entretien du processus peroxydatif.

5.3.1.3. Terminaison.

La réaction en chaîne s'arrête lorsque deux radicaux libres appartenant ou pas à la molécule, interagissent, créant entre eux des ponts. Elle est également freinée par la rencontre de piègeurs de radicaux telles que la vitamine E membranaire, ou par les pontages qui s'établissent entre les protéines membranaires et le malondialdéhyde.

Le tableau II résume les effets cellulaires de la peroxydations des membranes lipidiques.

²⁶ Chiu D., Kuypers F., Lubin B. (1989) Lipid peroxidation in human red cells. Seminars in hematology. 26(4), 257-276 .

Tableau II : Effets de la peroxydation des membranes lipidiques ¹⁵

ALTERATION DE LA BICOUCHE PHOSPHOLIPIDIQUE
<ul style="list-style-type: none">- Diminution de la fluidité.- Augmentation de la charge négative de surface.- Apparition d'une conductivité pour les protons.- Perte de la stabilité électrique et accroissement non spécifique de perméabilité.
ALTERATION DES MEMBRANES ET DES ORGANELLES CELLULAIRES
<ul style="list-style-type: none">- Inactivation des enzymes membranaires.- Oxydation des groupes thiols et accroissement de perméabilité.- Oedèmes et gonflement des mitochondries.- Découplage oxydation-phosphorylation.- Perte de cytochrome C et inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale.- Perturbation du système d'hydroxylation hépatique.- Décharge d'enzymes lysosomiales.- Activation des phospholipases membranaires.
ALTERATION DANS LE METABOLISME ET LE COMPORTEMENT
<ul style="list-style-type: none">- Destruction des tocophérols, des thiols, des stéroïdes et de la thyroxine.- Redistribution des ions.- Inhibition de la motilité cellulaire et ralentissement de la division cellulaire.

5.3.2. Produits de la peroxydation lipidique ²⁷

5.3.2.1. Les diènes conjugués.

Ils se forment à la suite de l'attaque de l'acide gras par un radical, lui arrachant un hydrogène, et le réarrangement moléculaire de cet acide gras en vue d'une meilleure stabilité.

Une molécule d'oxygène peut facilement se greffer sur le diène pour former un radical peroxy.

²⁷Dillard C., Tappel L. (1989) Lipid peroxidation products in biological tissues. Free Rad. Biol. Med., 7, 193-196.

5.3.2.2. Les hydroperoxydes.

Ils sont formés par la greffe d'un hydrogène sur le radical péroxyle; ces hydroperoxydes sont plus stables que leurs précurseurs.

5.3.2.3. Les alcanes.

L'éthane a été rapporté comme étant un produit final de la peroxydation lipidique. Il a été utilisé avec d'autres alcanes (hexane, pentane) pour estimer la vitesse de la peroxydation chez l'animal.

5.3.2.4. Le malondialdéhyde (MDA).

Il provient en grande partie de la peroxydation lipidique, mais peut aussi provenir du métabolisme de la cyclooxygénase. Il constitue un des marqueurs les plus utilisés pour évaluer la peroxydation lipidique *in vivo* ¹⁴.

La formation de dérivés d'oxydation dans les bicouches lipidiques, plus hydrophiles, entraîne des perturbations de la microarchitecture membranaire et altère les fonctions des enzymes et transporteurs membranaires²⁸. De plus, l'autocatalyse de la peroxydation peut aboutir à la formation des concentrations élevées de dérivés d'oxydation qui altèrent la perméabilité membranaire.

De telles perturbations sont suspectées dans diverses pathologies :

vasculaires (ischémie, infarctus...), musculaires, hépatiques, certains syndromes hémolytiques par des toxiques, toxicité de certains médicaments, vieillissement, cancérogenèse et mutagenèse¹⁵.

5.3.3. Quantification du phénomène de peroxydation lipidique.

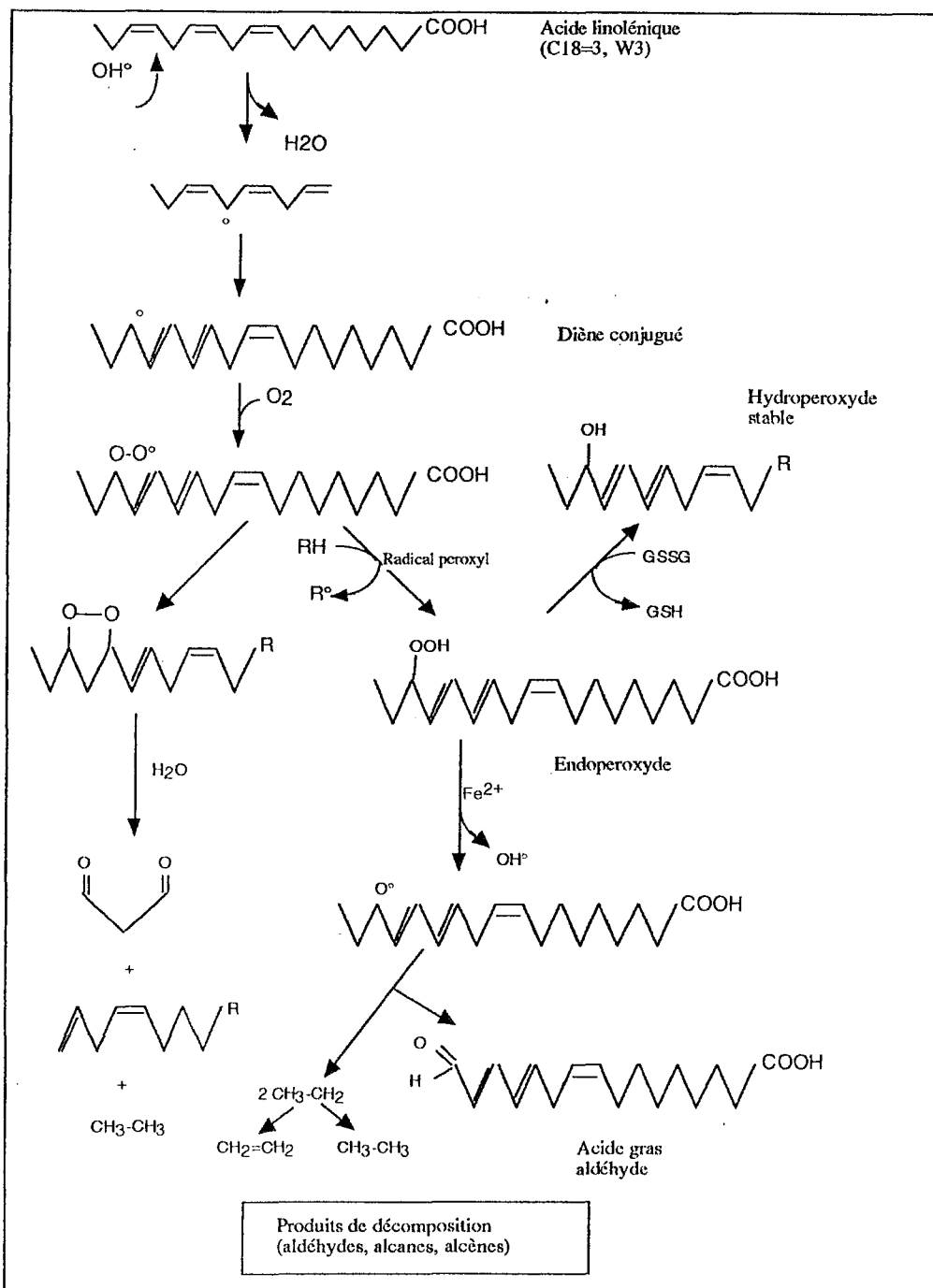
La détection et la mesure de l'intensité de la peroxydation lipidique sont possibles aussi bien *in vivo* que *in vitro*, et diverses méthodes sont utilisées; elles peuvent être divisées en plusieurs catégories en fonction de l'étape biochimique qu'elles explorent ²⁶ :

- Mesure de la disparition des acides gras polyinsaturés.
- Suivi de la formation de diènes et triènes conjugués, en mesurant l'absorbance du milieu dans l'UV (230-235 nm); méthode limitée par une absence de spécificité .
- Dosage des hydroperoxydes organiques (HPO).

²⁸ Chance B., Sies H., Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Reviews*, 59(3), 527-604.

- Dosage du malondialdéhyde, produit de dégradation des hydroperoxydes lipidiques, par la méthode à l'acide thiobarbiturique.
- Mesure des hydrocarbures gazeux produits lors de la peroxydation lipidique.
- Mesure des fonctions carbonyles formées dans les résidus acyles des phospholipides membranaires après leur peroxydation.

Fig. 2 : Schéma de la peroxydation lipidique induite par le fer et le radical Hydroxyle (Favier ²²).



6. SYSTEMES DE DEFENSE NATURELLE CONTRE LES FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE.

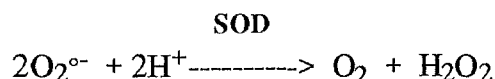
L'organisme est doté de systèmes régulateurs puissants pour faire face à une surproduction ponctuelle de radicaux libres. Ces systèmes de protection peuvent être divisés en deux groupes : enzymatiques et non enzymatiques.

6.1. Systèmes anti-radicalaires enzymatiques.

Dans la phase aqueuse des cellules, plusieurs systèmes enzymatiques sont présents afin de protéger l'intégrité fonctionnelle et structurale de la cellule face à la production de radicaux libres. Deux familles d'enzymes assurent l'essentiel de cette protection : les superoxydes dismutases et les réductases.

6.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD).

Ces enzymes catalysent la dismutation de l'ion superoxyde en oxygène et eau oxygénée



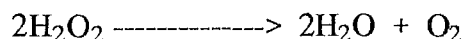
La vitesse de dismutation grâce à cette enzyme est fortement accélérée ($\times 10^9$). Deux types de SOD ont été mis en évidence dans la cellule : la SOD cuivre zinc, présente dans le cytosol, et la SOD manganèse, localisée dans les mitochondries ²⁹.

La présence de métaux de transition au niveau du site actif de ces enzymes est indispensable à leur action, ces métaux leur permettent d'effectuer les cycles d'oxydo-réduction.

La céruloplasmine présente dans le milieu extracellulaire, surtout au cours de l'inflammation, possède aussi un effet SOD-like pouvant dismuter les superoxydes, avec toutefois moins d'efficacité que la véritable SOD²².

6.1.2. La catalase.

Elle assure la dismutation biélectrique de l'eau oxygénée en oxygène et eau:



Dans la plupart des tissus, il semble que la catalase soit localisée uniquement dans les peroxysomes, organelles quantitativement mineures.

²⁹Deby C., Pencemail J. (1986) Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et moyens de défense. Presse Méd., 31, 1468-1473.

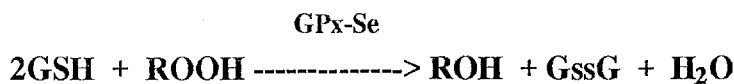
6.1.3. Les Glutathions peroxydases.

Elles nécessitent le maintien de réducteurs dans le milieu, elles sont donc coûteuses sur le plan énergétique. Elles jouent un rôle fondamental dans le système de protection. La glutathion peroxydase séléno-dépendante en est le maillon central.

La glutathion peroxydase (GPx) découverte par MILLS en 1957, est constituée de 4 sous unités, chacune renfermant un atome de sélénium qui joue le rôle de coenzyme. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (ROOH) par le glutathion (GSH) sans spécificité pour le radical R (R=H ou R=chaîne carbonée).

Elle fonctionne donc en consommant du glutathion réduit qui devra être régénéré par la glutathion réductase, elle-même consommant du NADPH renouvelé par le shunt des hexoses phosphates.

Les hydroperoxydes sont ainsi réduits en alcool correspondant (ROH) et l'eau oxygénée en eau, tout en produisant un équivalent de glutathion disulfure (GssG).



L'enzyme a été mise en évidence dans de nombreux organes et tissus humains ou animaux, en quantité variable selon les espèces et les tissus. Chez le rat, la plus forte activité se rencontre généralement dans le foie et les érythrocytes; elle est modérée dans le rein, les poumons et la rate, et faible dans le plasma. Chez l'homme on retrouve une activité élevée dans le foie et les érythrocytes.

D'autres types de glutathion peroxydases sont présents dans les cellules.

La phospholipide glutathion peroxydase³⁰, également sélénodépendante, elle est capable de réduire les hydroperoxydes des acides gras membranaires phospholipidiques, sans l'action préalable de la Phospholipase A2. Elle agit par un mécanisme identique à celui de la GPx.

La glutathion peroxydase non sélénodépendante : cette enzyme ne contient pas de sélénium dans son site actif, elle catalyse uniquement l'élimination des HPO (à la différence de la glutathion peroxydase sélénodépendante qui catalyse l'élimination des HPO et du peroxyde d'hydrogène).

6.2. Systèmes de défense non enzymatiques.

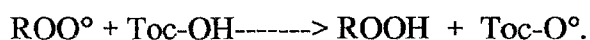
Ils sont composés de molécules biologiques capables de fixer et de détruire les radicaux libres ou d'en empêcher la formation. On distingue les éliminateurs ou les nettoyeurs (scavengers) qui neutralisent les radicaux °OH, et les atténuateurs (quencher), qui

³⁰Ursini F. Mairorino M., Gregolin C. (1985) The selenoenzyme phospholipide hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 839, 62-70.

neutralisent l'oxygène-singulet. Ces substances sont principalement endocellulaires et ne participent que de manière modeste à la défense extracellulaire.

6.2.1. Vitamines.

- Vitamine E : Située majoritairement dans les membranes, elle permet de piéger directement les radicaux peroxydes ROO° . Elle interrompt l'étape de propagation radicalaire et fournit un radical tocophéroxyl relativement stable³¹.



La susceptibilité des lipides membranaires à la peroxydation est directement liée à la concentration en vitamine E de la membrane³².

- Vitamine C (acide ascorbique) : C'est une inhibitrice de la peroxydation lipidique par une double action. Elle permet la récupération de la vitamine E oxydée et piège elle-même les radicaux libres. Ses propriétés antioxydantes lui permettent de piéger aussi bien les superoxydes que divers radicaux peroxydes. Cependant, en présence de métaux, elle peut provoquer la formation de ces mêmes radicaux³³.

- β carotène : Il piège de façon très efficace l'oxygène singulet, et agit comme antioxydant. La vitamine A a également une activité antioxydante³⁴.

6.2.2. Autres molécules.

D'autres substances telles que le glutathion, la transférine, la céruloplasmine ont été rapportées comme agents protecteurs.

Certains micronutriments (cuivre, zinc, sélénium,...), sont d'une importance capitale dans la défense antiradicalaire³⁵.

³¹Serbinov A.E., Kafan V., Hand D., Packer L. (1991) Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxydant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Rad. Biol. Med.*, 10, 263-275.

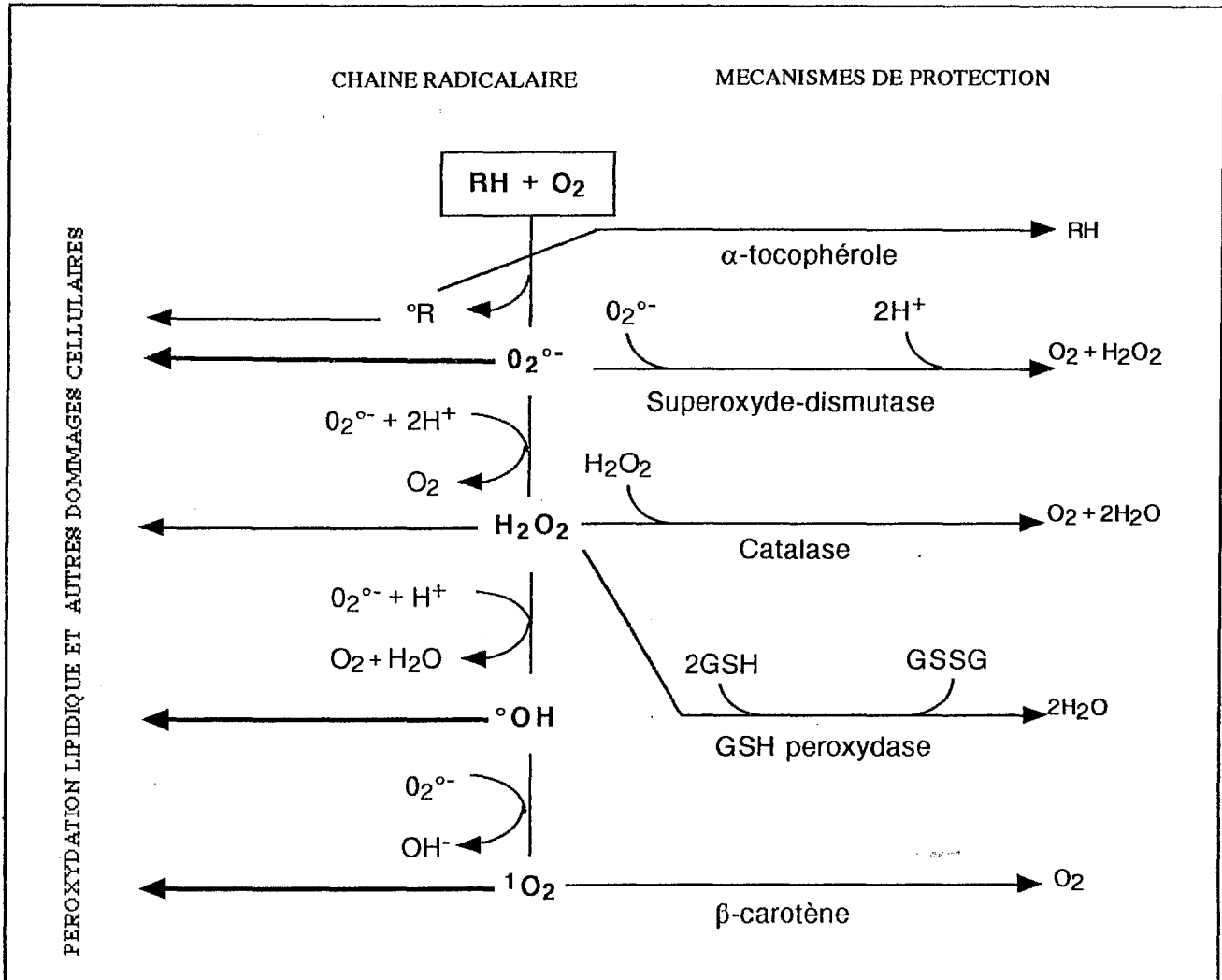
³²Kenneth S.G., Channa R., Richard W. (1989) Reduced glutathione effects on alpha-tocopherol concentrations of rat liver microsomes undergoing NADPH-dependent lipid peroxydation. *Lipids*, 24(11), 909-914.

³³Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1985) Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.*, 8, 22-26.

³⁴Burton G.W., Ingold K.V. (1984) Beta-caroten : an unusual type of lipid antioxydant. *Science*, 224, 569-573.

³⁵Machlin L.J., Bendich A. (1987) Free radical tissues damage : protective role of antioxydants nutrients. *FASEB J.*, 1, 441-445.

Fig. 3 : Représentation schématique de la chaîne de production radicalaire, et des mécanismes de protection cellulaires.



ANTICANCEREUX ET RADICAUX LIBRES

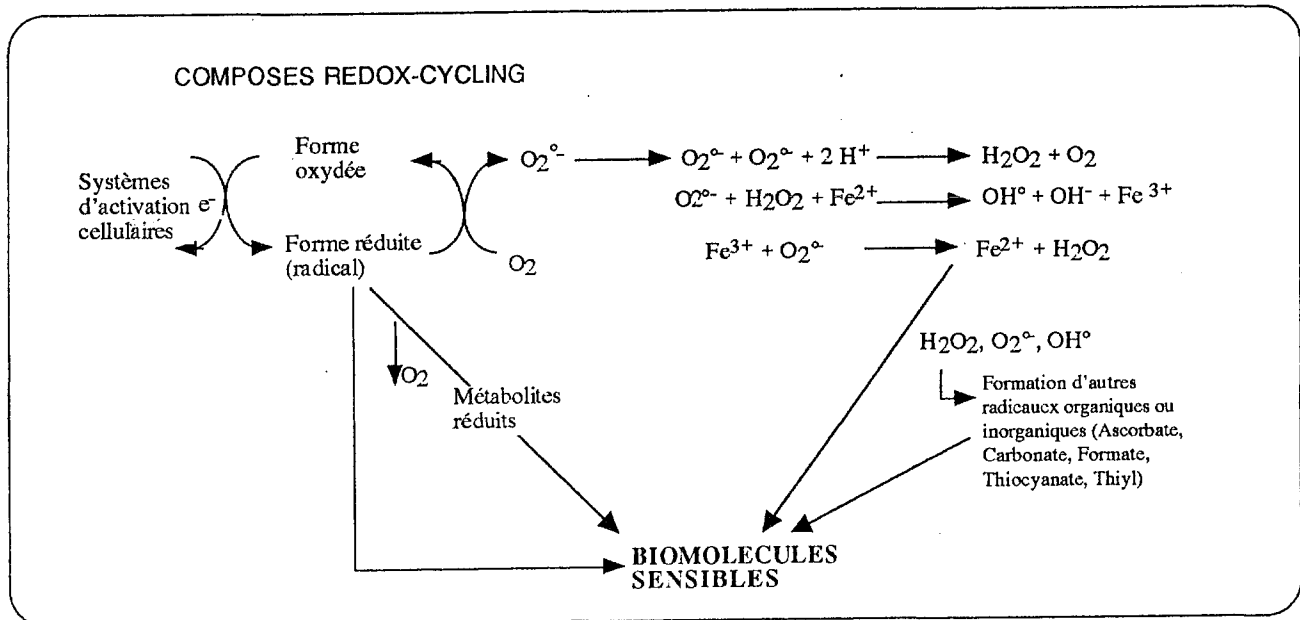
ANTICANCEREUX ET RADICAUX LIBRES

1. INTRODUCTION.

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 de telles drogues aux structures chimiques très variées, la bléomycine, les ellipticines et surtout les anthracyclines et les dérivés quinoniques, sont celles dont le mécanisme d'action radicalaire est le mieux compris à ce jour. Leur réduction par des systèmes enzymatiques ou non enzymatiques produit des intermédiaires instables présentant un caractère électrophile ou capables d'initier des réactions radicalaires³⁶. (le schéma de la fig.4 présente les principales ERO susceptibles d'être produites)

La nature des radicaux formés, la spécificité des lésions de l'ADN qu'ils induisent, leur place dans l'activité biologique et dans la toxicité, sont discutées dans ce chapitre.

Fig. 4 : Mécanisme général de production des radicaux oxygénés par les molécules redox-cycling.



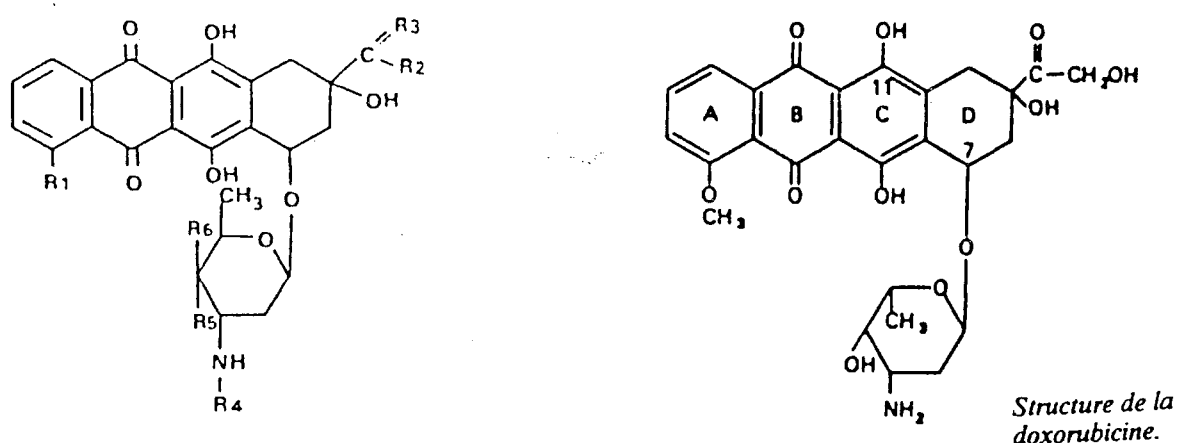
³⁶Kappus H., Sies H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism : Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37(12), 1233-1358.

2. LES ANTHRACYCLINES.

Les anthracyclines sont des dérivés quinoniques largement utilisés en thérapeutique anticancéreuse. La doxorubicine (adriamycine) et la daunorubicine sont de loin les médicaments les plus utilisés dans ce domaine, et on estime à 2 millions le nombre de patients ayant reçu de l'adriamycine³⁷.

La molécule de base des anthracyclines est constituée de deux parties distinctes : une aglycone, groupement chromophore, dérivé du naphtacène, et un sucre aminé sur le carbone 7 (Fig.5). Les nombreux composés ne diffèrent le plus souvent que par un radical fixé au groupement chromophore. Ces différences minimales de structure chimique suffisent parfois à modifier sensiblement les propriétés biologiques et la spécificité antitumorale de chacun des analogues.

Fig. 5 : Structure chimique des anthracyclines.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Doxorubicine	OCH ₃	CH ₂ OH	O	H	OH	H
Daunorubicine	OCH ₃	CH ₃	O	H	OH	H
Carminomycine	OH	CH ₃	O	H	OH	H
Rubidazone	OCH ₃	CH ₃	NNHCOC ₆ H ₅	H	OH	H
AD 32	OCH ₃	CH ₂ OCO(CH ₂) ₃ CH ₃	O	COCF ₃	OH	H
Épirubicine	OCH ₃	CH ₂ OH	O	H	H	OH
Esorubicine	OCH ₃	CH ₂ OH	O	H	H	H
Idarubicine	H	CH ₃	O	H	OH	H
Détorubicine	OCH ₃	CH ₂ OCOCH(OC ₂ H ₅) ₂	O	H	OH	H
THP-doxorubicine	OCH ₃	CH ₂ OH	O	H	OH	H

³⁷Powis G. (1989) Free radical formation by antitumor quinones. Free Rad. Biol. Med., 6, 63-101.

2.1. Anthracyclines et radicaux libres de l'oxygène.

2.1.1. Mécanisme de production radicalaire et les différents types de radicaux produits.

Le radical semiquinone et l'anion super-oxyde.

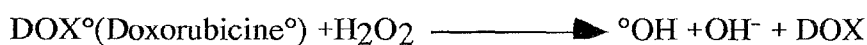
Sato et coll.³⁸ sont les premiers à mettre en évidence par résonance paramagnétique électronique la formation du radical semiquinone et la production de radicaux oxygénés en incubant l'adriamycine en présence de microsomes hépatiques. Plusieurs autres études réalisées par la suite ont confirmé la formation d'un radical semiquinone après réduction enzymatique ou chimique des anthracyclines³⁹. Le transfert d'un électron du radical semiquinone vers l'oxygène moléculaire donne naissance au radical super-oxyde qui est le premier maillon de la chaîne de réactions radicalaires (Fig. 6).

Les enzymes impliquées dans l'activation des anthracyclines sont des flavoprotéines telles que les cytochromes P-450 réductases microsomales et mitochondriales, la NADH déshydrogénase mitochondriale ou encore la xanthine oxydase et la ferridoxine réductase³⁶.

Le radical hydroxyle.

En présence de concentrations catalytiques de fer, le radical hydroxyle est ensuite formé par un mécanisme type Fenton. Celui-ci peut être à l'origine des différents effets biologiques qui sont la peroxydation lipidique, la dégradation du déoxysucre, et les cassures de l'ADN. La preuve de la formation de radicaux hydroxyles est apportée par l'individualisation de spectres caractéristiques du DMPO-OH en RPE et l'action inhibitrice de certains scavengers spécifiques⁴⁰.

Le radical °OH peut également être formé par action directe du radical semiquinone avec le peroxyde d'hydrogène.



³⁸Sato S., Iwaizumi M., Handa K., Tamura Y. (1977) Electron spin resonance study on the mode of generation of free radicals of daunomycin, adriamycin and carboquone in NADPH microsomal system. *Gann.*, 68, 603-608.

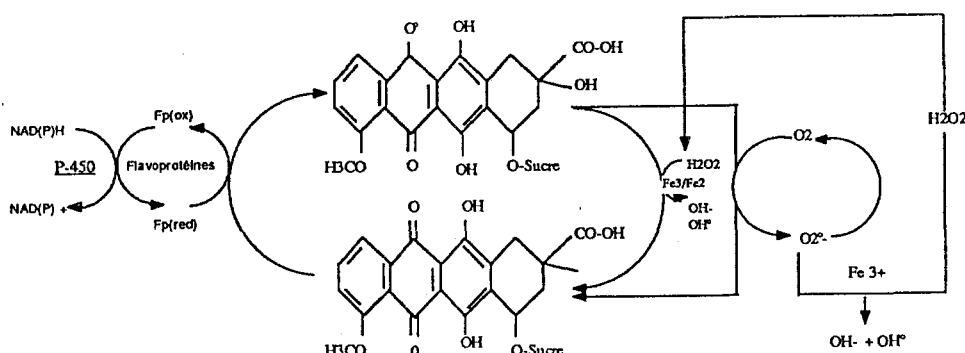
³⁹Cummings J. (1991) The molecular pharmacology of Doxorubicin in vivo. *Eur. J. Cancer*, 27(5) 532-535.

⁴⁰Kalyanaraman B. Morehouse K.M. Masson R. P. (1991) An electron paramagnetic resonance study of the interaction between the adriamycin semiquinone, hydrogen peroxide, iron-chelators, and radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 283(1), 164-170.

Cette réaction, dont la constante de vitesse est de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ est inhibée par de fortes concentrations en oxygène, et concurrencée par la réaction du radical semiquinone avec le superoxyde ($K=10^8 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$)⁴¹. Plusieurs travaux mettent en évidence la formation de radicaux °OH, mais il paraît certain que d'autres radicaux, aussi réactifs, soient formés par action de la semiquinone avec l'H₂O₂. En effet les cassures du déoxyribose sont inhibées par certains scavengers du radical °OH mais pas par d'autres. Ces radicaux sont appelés des "crypto" radicaux hydroxyles³⁷.

La génération de radicaux oxygénés par les anthracyclines a été démontrée dans tous les tissus examinés : foie, rein, coeur, poumon, pancréas et érythrocytes.

Fig. 6 : Schéma représentatif des mécanismes de production des radicaux oxygénés par l'adriamycine.



⁴¹Kalyanaraman B., Sealy R.C., Sinha B.K. (1984) An electron spin resonance study of the reduction of peroxydes by anthracyclines semiquinones. *Biochem. Biophys. Acta.*, 799, 270-275.

2.1.2. Anthracyclines et complexes métalliques.

Une des caractéristiques des anthracyclines est leur capacité à former des complexes particulièrement stables avec le fer et d'autres métaux redox. Cette forme complexe, pourrait être la forme active *in vivo*.

Les anthracyclines telles que l'adriamycine, la daunorubicine, la 5-iminodaunorubicine ou la carminomycine forment des complexes avec le fer(III) composés de 3 molécules d'anthracyclines pour une molécule de fer(III). Chaque molécule d'anthracycline est à son tour liée par son groupement carbonyle ou phénolate à une deuxième molécule d'anthracycline. L'ensemble forme un complexe à 6 membres³⁷.

La constante de stabilité du complexe anthracycline-fer est de 10^{28} à 10^{34} . C'est l'une des valeurs les plus élevées décrites pour un complexe du fer.

L'adriamycine, ainsi que les autres anthracyclines sont capables d'extraire le fer de la ferritine, forme majeure de stockage du fer dans les cellules. L'extraction du fer est facilitée par la réduction du fer (III) en fer (II) par le radical semiquinone ou le radical superoxyde⁴².

Le potentiel oxydoréducteur des complexes anthracycline-fer est plus faible que celui des anthracyclines libres. En effet la daunomycine-fer forme très peu de radicaux $O_2^{\circ-}$ et l'adriamycine-fer n'en forme pas du tout en présence de NADH déshydrogénase et de NADH.

Le complexe adriamycine-fer(III), est par contre, capable de subir une autoréduction en complexe adriamycine-fer(II) par un mécanisme de transfert d'électrons intramoléculaire⁴³.

En présence d' O_2 , le complexe fer(II) est ensuite rapidement oxydé en fer(III) avec transfert d'un électron sur l'oxygène moléculaire et formation d' $O_2^{\circ-}$, puis d' H_2O_2 .

Les thiols réduisent directement le complexe sans passer par le radical semiquinone. Ainsi, la cystéine ou le glutathion réduisent la doxo-fer(III) avec consommation d'oxygène et formation de radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène⁴⁴, cette réaction est inhibée par le 4-7 diphényl 1-10 phénantroline sulfonate, chélateur spécifique du fer (II) indiquant que le fer (II) est formé pendant la réaction.

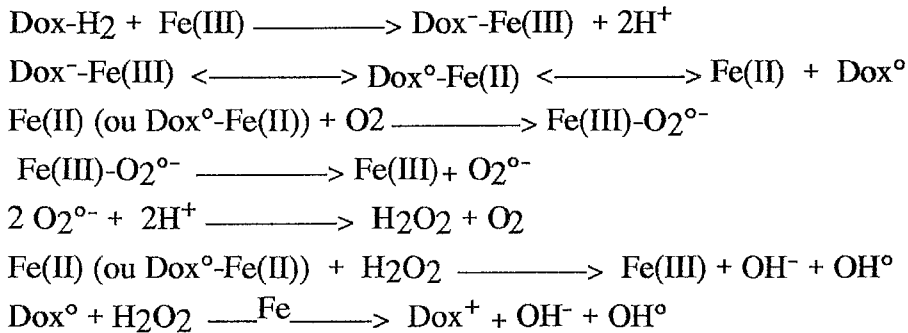
⁴²Minotti G., Di Gennaro M., D'ugo D., Granone P. (1991) Possible source of iron for lipid peroxidation. *Free Rad. Res. Comms.*, 12-13, 99-106.

⁴³Hasinof B. (1989) Self reduction of the iron(III)-doxorubicin complex. *Free Rad. Biol. Med.*, 7, 583-593.

⁴⁴Takahashi Naohiro Schreiber J., Fischer V. Mason R. (1987) Formation of glutathione-conjugated semiquinones by the reaction of quinones with Glutathione : An ESR study. *Arch. Biochem. Biophys.*, 252(1), 41-48.

L'inhibition par des chélateurs de fer de la production de radicaux oxygénés est aussi à la base des essais en thérapeutique de L'ICRF-187 analogue de l'EDTA dans le but de diminuer les effets secondaires des anthracyclines, notamment cardiaques.

Le mécanisme de formation des radicaux oxygénés par le complexe métallique peut être schématisé comme suit : (Dox. pour doxorubicine ou adriamycine)



La SOD et la catalase sont de faibles inhibiteurs de la peroxydation induite par le complexe doxorubicine-fer alors que des scavengers tel que le mannitol ou le diméthyl sulfoxyde sont fortement inhibiteurs.

La réaction de dégradation du déoxyribose par la doxorubicine-fer n'est pas inhibée par la SOD ou la catalase. Ce même processus est inhibé par le mannitol ou le thiourée mais pas par le benzoate ou le formate qui sont aussi des scavengers des radicaux OH[°]. Ces deux observations confortent l'hypothèse selon laquelle des espèces réactives autres que le radical °OH mais de réactivité similaires sont formées au cours des réactions d'oxydo-réduction du complexe anthracycline-fer.

Les autres métaux de transition tel que le cuivre peuvent se substituer au fer (III) et fer(II) dans les réactions de dégradation de l'ADN thiols-dépendantes. La doxorubicine-cuivre peut donner lieu aux mêmes réactions radicalaires que la doxorubicine-fer. Certains auteurs supposent que le complexe doxorubicine-cuivre peut être en réalité la forme physiologiquement active de la drogue dans l'organisme à cause de l'abondance relative du cuivre libre par rapport au fer libre dans les cellules⁴⁵.

2.2. Rôle des radicaux libres dans l'activité biologique des anthracyclines.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'activité antitumorale des anthracyclines :

⁴⁵Hassinof B.D., Davey J.P., O'Brien P.J. (1989) The Adriamycin (doxorubicin)-induced inactivation of cytochrome oxydase on the presence of iron and cooper. *Xenobiotica*, 19(2), 231-241.

- Intercalation entre les bases adjacentes de l'ADN et inhibition de la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines.

- Inhibition de la topo-isomérase II, qui se traduit par la formation de complexes clivables de l'ADN et qui transforme ainsi cette enzyme en véritable poison endogène. Ce processus est considéré aujourd'hui comme le mécanisme majeur de l'activité cytotoxique des anthracyclines³⁹.

- Dégradation de l'ADN, des membranes cellulaires et des protéines par des réactions radicalaires. Ce mécanisme a suscité un grand nombre de travaux.

2.2.1. Dégradation de L'ADN.

La réduction chimique ou enzymatique en radical semiquinone donne lieu à une liaison covalente des résidus anthracycliques avec L'ADN⁴⁶.

Les scavengers du radical °OH, les chélateurs du fer, la catalase, et la SOD réduisent la cytotoxicité de l'adriamycine sur des cellules tumorales en culture. Ces mêmes agents se sont révélés sans effet sur la cytotoxicité de l'imino-daunorubicine, molécule non génératrice de radicaux oxygénés. En outre, il existe une corrélation entre la production du radical °OH mesuré en spin trap, et la cytotoxicité de l'adriamycine sur des cellules humaines provenant de cancer du sein. Ceci suggère l'existence effective d'une attaque de l'ADN médiée par le radical °OH, soit par l'oxydation de certaines bases, soit par des cassures et ou des pontages au niveau de la chaîne.

Cependant, il n'existe pas de consensus à ce sujet. En effet :

- Le radical semiquinone présente une affinité augmentée pour l'ADN, mais il perd complètement son pouvoir redox sous sa forme liée⁴⁶.

- La réduction des anthracyclines et la formation de radicaux oxygénés nécessitent la présence de systèmes réducteurs enzymatiques présents dans le réticulum endoplasmique, relativement loin de l'ADN.

Ces deux problèmes sont clarifiés depuis les travaux de Mundi⁴⁷ montrant que les anthracyclines sous forme complexées avec le fer peuvent s'intercaler au niveau de l'ADN et former un complexe ternaire en conservant leurs propriétés redox-cycling. Ils demeurent ainsi aussi efficaces que le complexe libre en ce qui concerne le transfert d'un électron à l'oxygène moléculaire par un mécanisme d'auto-réduction, et pour le

⁴⁶Berg H., Horn G., Luthard T V. (1981) Interaction of anthracycline antibiotics with biopolymers, polarographic behavior and complexes with DNA. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 8, 537-558.

⁴⁷Mundi J.R.F., Sinha B.K., Gianni L., Meyers C.E. (1984) Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracyclines-iron complex. *FEBS Lett.*, 172, 226-230.

clivage du peroxyde d'hydrogène en radical $^{\circ}\text{OH}$. L'adriamycine-fer provoque un clivage de l'ADN par un processus stimulé par les thiols et inhibé par la catalase, ce qui évoque l'intérêt du peroxyde d'hydrogène.

En outre, Dorrochow et coll.⁴⁸ ont souligné l'importance de la génération intracellulaire du peroxyde d'hydrogène dans la cytotoxicité des anthracyclines *in vitro*. En effet, la catalase et le PZ-51 (2-phenyl-1,2-benzisoxazol-3(2H)-one), composé sélénié à activité glutathion peroxydase like, protègent les cellules tumorales d'Ehrlich de la cytotoxicité de l'adriamycine. D'autres auteurs ont récemment confirmé cette hypothèse en observant que le PZ-51 diminuait la cytotoxicité et la toxicité cardiaque de l'adriamycine chez des souris⁴⁹.

2.2.2. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique induite par les anthracyclines *in vitro* nécessite des concentrations catalytiques de fer⁵⁰. L'initiation du phénomène peroxydatif peut être réalisé soit par le radical semiquinone, par action directe sur les acides gras polyinsaturés, soit par le complexe anthracycline-fer, ou encore, via les radicaux hydroxyles formés au cours de l'activation microsomale ou mitochondriale.

Des expériences ont montré que des noyaux isolés peuvent également stimuler la production radicalaire anthracyclines-dépendante, ce qui laisse penser que ces radicaux peuvent être produits à proximité de l'ADN, provoquant la peroxydation des membranes nucléaires et attaquant l'ADN.

La peroxydation des membranes nucléaires contribue aux altérations morphologiques et biochimiques des noyaux cellulaires. Cela pourrait aussi expliquer pourquoi des anthracyclines tel que l'AD-32 (N-trifluoracetyl-doxorubicine-14-valérate), qui ne se lie pas à l'ADN et qui apparemment ne traversent pas les membranes nucléaires, peuvent causer des cassures et des pontages au sein de l'ADN des cellules tumorales.

La stimulation de la peroxydation lipidique a été également étudiée *in vivo*. Coudray et coll.⁵¹ ont rapporté une augmentation significative de MDA chez des rats traités par l'adriamycine par rapport aux rats témoins. Cette peroxydation est significativement

⁴⁸Doroshov L.H., Akman S., Esworthy S., Chu F.F., Durbe T. (1991) Doxorubicin resistance conferred by selective enhancement of intracellular glutathione peroxydase or superoxide dismutase content in human MCF-7 breast cancer cells. *Free Rad. Res. Comms.*, 12-13, 1-10.

⁴⁹Pritsot C. A. Sokoloff M., Gustafson D.L. (1992) PZ-51 (Ebselen) *in vivo* protection against Adriamycin-induced mouse cardiac and hepatic lipid peroxidation and toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 44(4), 839-841.

⁵⁰Winterbourn C.C., Vile G.F., Monteiro H.P. (1991) Ferritin, lipid peroxidation and redox-cycling xenobiotics. *Free Rad. Res. Comms.*, 12-13, 107-114.

⁵¹Coudray C., Mouhiedine S., Richard M.J., Arnaud J., De Leiris J., Favier A. (1992) Effect of adriamycin on chronic cardiotoxicity in selenium deficient rats. *Basic Res. Cardiol.*, 87, 173-183.

inhibée par le sélénium. D'autres études ont montré l'effet protecteur de la vitamine E et du B carotène⁵².

En revanche les essais chez l'homme sont peut nombreux, cependant, Sangeetha et coll.⁵³, ainsi que Faber et coll.⁵⁴, ont récemment montré une augmentation significative du MDA chez des patients traités par l'adriamycine. Ces études restent, néanmoins difficilement interprétables du fait de l'association quasi-systématique d'autres anticancéreux à l'adriamycine pendant les protocoles de chimiothérapie.

2.2.3. Radicaux libres et résistance aux anthracyclines.

Benchekroun et coll.⁵⁵ ont évalué la production de radicaux °OH en présence d'adriamycine par différentes lignées cellulaires glioblastomateuses dont la résistance est plus au moins importante vis-à-vis de l'adriamycine.

Les lignées sensibles ont manifesté une production de radicaux °OH inhibées par la catalase, la superoxyde dismutase ainsi que par des anticorps anticytochrome P-450-réductase. Dans les cellules hautement résistantes à l'adriamycine, cette production de radicaux °OH est réduite de 20% par rapport aux cellules chimiosensibles. Les activités en SOD et en GPX sont plus élevées dans les cellules adriamycine résistantes. La résistance des cellules à l'adriamycine peut donc, en partie s'expliquer par une plus faible production de radicaux °OH due à une suractivité en enzymes antioxydantes.

Les mêmes observations ont été rapportées en utilisant des lignées de cellules de cancer de sein MCF-7, où la lignée résistante à l'adriamycine s'est révélée avoir une très faible capacité de génération de radicaux °OH par rapport aux cellules sensibles.⁵⁶

L'hypothèse radicalaire dans le mécanisme d'action des anthracyclines paraît donc plausible mais les dommages oxydatifs des molécules d'ADN ne sont pas les seuls mécanismes d'action radicaux libres-dépendants des anthracyclines. La peroxydation

⁵²Glenn F.V., Winterbourn C.C. (1988) Inhibition of adriamycin-promoted microsomal lipid peroxidation by β -caroten α -tocopherol and retinol at high and low oxygen partial pressures. *FEBS Lett.*, 238(2), 353,-356.

⁵³Sangeetha P., Das U.N., Koratkar R., Suriaprabha P. (1990) Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Rad. Biol. Med.*, 8, 15-19.

⁵⁴Faber M., Hida H., Coudray C., Mousseau M., Favier A., (1993) Lipid peroxidation products and trace elements statuts in patients with cancer before and after chemotherapy including Adriamycin. *Biol.Trace Elem. Res.*, Sous presse.

⁵⁵Benchekroun M.N., Sinha B.K., Robert J. (1993) Doxorubicin induced oxygen free radical formation in sensitive and doxorubicin-resistant variants of rat glioblastoma cell lines. *FEBS*, 322(3), 295-298.

⁵⁶Sinha B.K., Mimnaugh E.G. (1990) Free radicals and anticancer drug resistance : oxygen free radicals in the mechanism of drug cytotoxicity and resistance by certains tumors. *Free Rad. Biol. Med.*, 8, 567-581.

des lipides membranaires et la consommation accrue des protecteurs cellulaires paraissent jouer un rôle majeur dans la cytotoxicité des anthracyclines.

2.2.4. Cardiotoxicité des anthracyclines et radicaux libres.

L'utilisation en clinique des anthracyclines, et en particulier de l'adriamycine est limitée à cause de leur cardiotoxicité cumulative dose dépendante particulièrement importante. Cette cardiotoxicité caractéristique est souvent rattachée à la production de radicaux oxygénés par ces molécules et aux phénomènes peroxydatifs qui en découlent. Plusieurs arguments allant dans ce sens sont rapportés dans la littérature:

- La doxorubicine, la daunorubicine, et les autres anthracyclines, stimulent la formation du peroxyde d'hydrogène, du radical superoxyde, et du radical °OH par les fractions cellulaires submitochondriales préparées à partir du tissu cardiaque⁵⁷.

- La doxorubicine, la daunorubicine, la rubidazone, mais pas la 5-imino-daunorubicine, stimulent directement l'oxydation de l'oxymyoglobine avec formation de radicaux oxygénés.

- Il existe une corrélation étroite entre la toxicité cardiaque des anthracyclines in vivo et leur potentiel électrochimique de génération d'ERO⁵⁸. Les dérivés 5-imino-anthracyclines, connus pour être moins cardiotoxiques sont de moins puissants générateurs de radicaux libres de l'oxygène que les anthracyclines dont ils découlent.

- Comparé aux autres organes, le coeur a une teneur moins élevée en SOD, catalase, et en glutathion transférase⁵⁷.

- L'administration de l'adriamycine provoque chez le rat une baisse sélective de la GPX et du GSH et une augmentation des activités SOD et catalase cardiaques.

- Le cycle redox de l'adriamycine initié par la NADH déhydrogénase cardiaque, provoque l'inhibition de la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique⁵⁹. La N-acétyl-cystéine, la glutathion peroxydase protègent contre cette inhibition, ce qui suggère l'implication des groupements thiols dans ce phénomène.

- La vitamine E⁶⁰, le sélénium⁵¹ ainsi que d'autres molécules antioxydantes, réduisent la cardiotoxicité de l'adriamycine chez le rat.

⁵⁷Dorocho J.H., Davis K.J.A. (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. J. Biol. Chem., 261(7), 3068-3074.

⁵⁸Lown W., Chen H., Plambeck J.A. (1982) Further studies on the generation of reactive oxygen species from activated anthracyclines and the relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects. Biochem. Pharmacol., 31(4) 575-581

⁵⁹Vile G., Winterbourn C. (1990) Thiol oxidation and inhibition of Ca-ATPase by Adriamycin in rabbit heart microsomes.

⁶⁰Meyers C., Mc Guire W., Young R., (1978) Adriamycin : Amélioration de la toxicité par α -tocophérol. Cancer treat. Rep., 60(7), 961-962.

Ces mêmes agents antiradicaux demeurent inefficace dans la prévention des cardiomyopathies chroniques chez l'homme.

3. LA MITOXANTRONE

La mitoxantrone est un anticancéreux de structure anthracène-dione proche de celle des anthracyclines. Son mécanisme d'action le plus connu est son aptitude à s'intercaler dans l'ADN et d'inhiber sa synthèse et celle de l'ARN. Un mécanisme d'action par le biais de l'inhibition de la topoisomérase II a également été établi⁶¹.

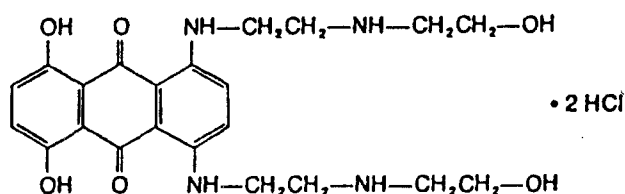


Fig 7: Structure chimique de la mitoxantrone

La mitoxantrone s'est révélée être un mauvais substrat pour les NADPH cytochrome P-450 réductase comparée aux anthracyclines et aux autres dérivées quinoniques. Le faible taux de réduction enzymatique, exclut pour certains auteurs la possibilité d'un mécanisme d'action médié par les radicaux oxygénés³⁷.

Ficher et coll.⁶² ont, par contre, rapporté que ce produit est un bon substrat pour les peroxydases qui catalysent la formation du radical mitoxantrone en présence d'H₂O₂. Ce radical peut être détecté en RPE. L'activation oxydative de la mitoxantrone en produit réactif pourrait, selon eux, faire partie du mécanisme d'action antitumoral de cette molécule.

Même si l'activation de la mitoxantrone en radicaux semiquinones est effective, les quantités générées ne semblent pas en mesure d'induire la peroxydation des lipides dans les microsomes hépatiques et cardiaques⁶³. Cela explique peut-être la faible

⁶¹Tewey K.M., Rowe T.C., Halligan B.D., Lui L.F. (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA Topoisomerase II. *Science*, 226, 466-468.

⁶²Fisher G.R., Patterson L.H. (1991) DNA strand breakage by peroxidase-activated mitoxantrone. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 65-68.

⁶³Patterson L.H., Gandecha B.M., Brown J.R. (1983) 1,4 bis(2-((2-hydroxyethyl) amino)-9,10-anthracendione, an anthraquinone antitumor agent that does not cause lipid peroxidation in vivo, comparison with daunorubicin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2(110), 399-405.

cardiotoxicité de la mitoxantrone en comparaison avec les anthracyclines classiques. Par ailleurs, la mitoxantrone, exerce un effet inhibiteur sur la peroxydation NADPH dépendante dans les sarcosomes et les mitochondries cardiaques³⁷. Cette inhibition est probablement due à une interaction de la drogue avec le cytochrome P-450 qui conduit à la formation de complexes bimoléculaires avec les groupements prosthétiques des FAD et des FMN.

4. LA BLEOMYCINE (BLM)

La bléomycine est un anticancéreux antibiotique de structure glycopeptidique. Elle est utilisée avec succès dans un grand nombre de protocoles de traitements de cancers épidermoïdes (voies aérodigestives supérieures, col utérin, vessie), de carcinomes germinaux, notamment testiculaire ou extra gonadique, de lymphomes non hodgkiniens, de la maladie de hodjkins, sarcome de Kaposi et les pleurésis néoplasiques. Son activité antitumorale est liée à un mécanisme oxygène et fer dépendant, de clivage de l'ADN.

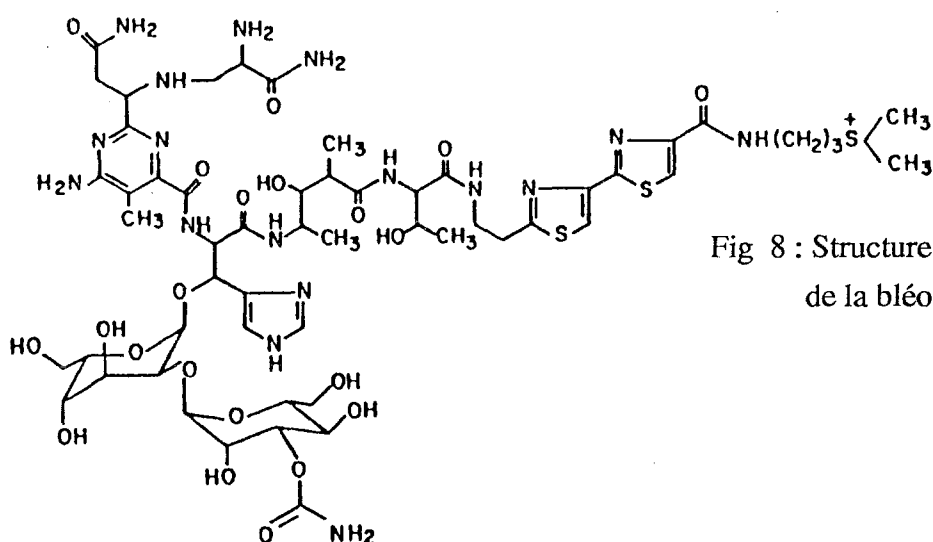


Fig 8 : Structure chimique de la bléomycine.

4.1. Bléomycine et radicaux libres

Les glycopeptides qui constituent la bléomycine contiennent un site de liaison avec l'ADN (le peptide S) et un site de fixation du fer. La cytotoxicité de la BLM est attribuée à son aptitude à former un complexe fer-droque, qui une fois fixée sur l'ADN

(préférentiellement au niveau de la guanine), les ions ferreux subissent une oxydation en ions ferriques, et l'électron libéré va participer à la genèse d'espèces réactives de l'O₂ (°OH, O₂^{°-}). L'importance du métal mobilisable (le fer) dans le contrôle de l'activité de la BLM a été démontrée. En effet, la bléomycine complexée aux autres métaux (zinc, cuivre ou cobalt) est incapable de provoquer des scissions de l'ADN. En outre, la désferrioxamine, chélateur du fer, inhibe le clivage de l'ADN *in vitro* et diminue la cytotoxicité *in vivo*⁶⁴.

4.1.1. Activation de La Bléomycine-fer.

L'activation de la bléomycine passe par un processus d'oxydoréduction du complexe BLM-Fer et la génération de radicaux oxygénés.

Scheulen et coll.⁶⁵ ont montré que les systèmes réducteurs mitochondriaux et microsomaux (Cytochrome P-450 réductases), catalysent le cycle redox du complexe Bléomycine-fer. En présence d'ADN, ils ont observé la formation de malondialdéhyde parallèlement à l'augmentation de la consommation du NADPH et de l'oxygène moléculaire. Le MDA est formé à partir d'un conjugué base-propenal (BASE-CH = CH- CHO) où le propenal provient du déoxyribose .

Les enzymes NADPH-dépendantes isolées des noyaux cellulaires sont aussi capables d'activer le complexe bléomycine-fer.

La formation d'un complexe intermédiaire O₂-Fer(II)-BLM est nécessaire pour aboutir à la rupture des brins de l'ADN. La dégradation de l'ADN est stimulée *in vitro* par la catalase, et inhibée par la SOD. Le glutathion n'a pas d'effet sur cette activité.

En absence d'ADN, la bléomycine activée se décompose spontanément, probablement par un mécanisme d'auto-oxydation⁶⁶ .

La résistance à la bléomycine est liée à une déplétion en ions ferreux dans les cellules. En effet, l'étude réalisée par Smith⁶⁷ sur des fibroblastes humains (MRC5CVI), a montré une cytotoxicité proportionnelle à la concentration en fer, alors que sans apport

⁶⁴ Sasville E.A., Peisach J., Horwitz B. (1978) Effect of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by Bleomycin. *Biochemistry*, 17, 2740-2754.

⁶⁵ Scheulen M.E. Kappus H. Thyssen D., Schmidt C.G. (1981) Redox cycling of Fer(III)-Bleomycin by NADPH-Cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Pharmacol.*, 24(30), 3385-3381.

⁶⁶ Favaudon V. (1982) On the mechanism of reductive activation in the mode of action of some anticancer drugs. *Biochimie*, 64, 457-475.

⁶⁷ Smith P.J. (1987) Ferrous iron-mediated enhancement of DNA damage and recovery potential in Bleomycin treated human cells. *Biochem. Pharmacol.*, 4(36), 475-480.

de fer, cette cytotoxicité atteint un plateau et ne dépend pas de la concentration en drogue. Les taux endogènes en fer peuvent donc modifier la sensibilité des cellules humaines à la bléomycine.

4.1.2. Radicaux libres et toxicité pulmonaire de la Bléomycine

L'utilisation de la bléomycine en clinique cancérologique est limitée par sa toxicité pulmonaire caractéristique. Cette toxicité dose-dépendante et cumulative, survient à des doses supérieures à 200mg/m².

Le mécanisme biochimique exact de cette toxicité n'est que partiellement élucidé. Néanmoins, il semble que l'aptitude de la bléomycine à générer des espèces réactives de l'oxygène en présence de ce dernier soit un phénomène crucial dans cette toxicité, et ce, malgré quelques controverses⁶⁸.

L'administration intratrachéale de bléomycine chez le rat, provoque la stimulation de la peroxydation lipidique en parallèle à l'augmentation des activités enzymatiques antioxydantes qui participent aux mécanismes tissulaires de protection contre les radicaux oxygénés.

L'administration de catalase et de SOD sous forme de liposomes chez des rats traités par la bléomycine, réduit la toxicité pulmonaire observée comparée à celle observée chez les rats témoins⁶⁹.

5. LA MITOMYCINE C (MMC)

C'est un anticancéreux antibiotique isolé des cultures de *streptomyces caespitosis*. Il est alkylant mono ou bifonctionnel, et utilisé en particulier dans les adénocarcinomes de l'estomac, du colon, du pancréas de l'utérus et de leurs métastases. Sa toxicité la plus sérieuse est une myélosuppression cumulative.

Son activité antitumorale a été attribuée à ses groupements aziridinyl, et carbamates, . Les groupements se comportent comme des sites alkylants, et la structure participe à la formation d'ERO³⁷.

⁶⁸Tom W.M. Montgomery M.R.(1980) Bleomycin toxicity : alterations in oxidative metabolism in lung and liver microsomal fractions. Biochem. Pharmacol., 29, 3239-3244.

⁶⁹Ledwozym L. (1991) Protective effect of liposomes-entrapped superoxide dismutase and catalase on bleomycin-induced lung injury in rats. Acta Vet. Hung., 39, 215-224.

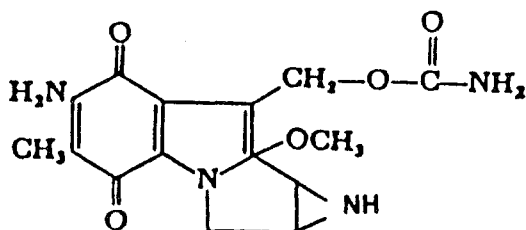


Fig 9 : Structure chimique de la mitomycine

L'activation réductive de la mitomycine génère des intermédiaires réactifs, capables d'induire des pontages interbrin au niveau de la molécule d'ADN ⁷⁰. En effet, la réduction anaérobie de la mitomycine C en solution aqueuse par du borohydrure de sodium, donne naissance à une espèce intermédiaire révélée en spin-trap et correspondant au radical semiquinone. Ce radical semiquinone est également formé en présence de systèmes enzymatiques réducteurs tels les cytochromes p-450 réductases, la xanthine oxydase, et la ferrédoxine réductase. En présence d'oxygène, le radical semiquinone formé après réduction mono-électronique de la mitomycine va transférer un électron à l'oxygène moléculaire, générer le radical superoxyde et régénérer la mitomycine. Ces réactions ont été établies par la détection en RPE des radicaux $O_2^{\circ-}$ et $^{\circ}OH$. Ces radicaux sont pour certains auteurs responsables de la dégradation de l'ADN observée in vivo et in vitro ⁷¹. En outre, la mitomycine stimule la peroxydation lipidique des microsomes pulmonaires ³⁶ et hépatiques (résultats personnels) en présence du NADPH.

La mitomycine C est généralement plus active sur les cellules en hypoxie, et toute tentative d'explication du mécanisme d'action de cette drogue doit tenir compte de cette caractéristique ⁷².

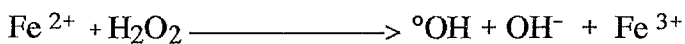
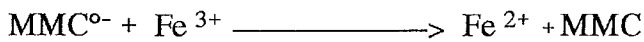
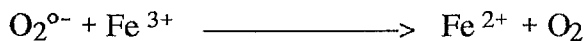
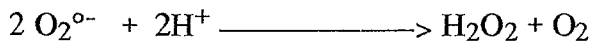
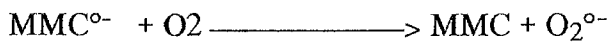
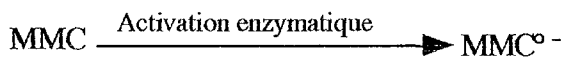
⁷⁰Sartoelli A.C. (1986) The role of mitomycin antibiotic in the chemotherapy of solid tumors. *Biochem. Pharmacol.*, 1(35), 67-69

⁷¹Bachur R.N., Gordon S.L., Gee M.V. (1978) A general mechanism for microsomal activation of quinones anticancer agents to free radicals. *Cancer Res.*, 38, 1745-1750

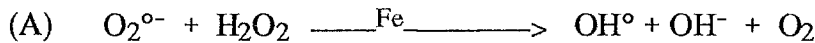
⁷²Graham M.A., Riley R.J., Kerr D.J. (1991) Drug metabolism in carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.*, 51, 275-289.

Gutteridge et coll.⁷³ ont rapporté que la réduction enzymatique de la mitomycine provoque la dégradation du déoxyribose dans une réaction stimulée dans les conditions de faibles concentrations en oxygène. Cette réaction est inhibée par les scavengers du radical °OH ainsi que par la SOD et la catalase, et bloquée par les chélateurs du fer tels que le desferrioxamine et le DETEPAC. Les auteurs suggèrent que, comme pour les anthracyclines, la mitomycine sémiquinone réagit directement avec le peroxyde d'hydrogène pour former le radical °OH, dans une réaction inhibée par de fortes concentrations en O₂. Ceci pourrait expliquer la toxicité sélective de la mitomycine C pour les cellules en situation d'hypoxie.

On peut imaginer le mécanisme d'activation de la mitomycine C suivant :



Les réactions globales sont :



ou la réaction (A) prédomine en situation de normoxie, et la réaction (B) devient beaucoup plus efficace en cas de faible concentration en oxygène.

Le rôle des radicaux oxygénés semble être établie dans la cytotoxicité de la mitomycine, mais le mécanisme d'action exacte de la mitomycine n'est néanmoins pas acquis, et des controverses subsistent sur l'importance de l'activation de la drogue in situ par les P-450 réductases par rapport à l'activation DT-diaphorases-dépendante (réduction à 2 électrons). En effet, plusieurs travaux ont montré que la DT-diaphorase

⁷³Gutteridge J.M.C., Quinlan G.J., and Wilkins S. (1984) Mitomycin C induced deoxyribose degradation inhibited by superoxide dismutase. FEBS, 1(167), 37-41

peut activer la molécule dans des conditions d'aérobie⁷⁴, alors que Dulhanty et coll.⁷⁵ ont montré que la DT-diaphorase ne joue aucun rôle dans les conditions d'hypoxie. Le dilemme se complique si l'on considère les travaux de Bligh⁷⁶ qui rapportent que la P-450 réductase n'active pas la mitomycine dans les conditions d'hypoxie.

6. LE CELLIPTIUM

Le celliptium ou N2-méthyl-9-hydroxyellipticinium (NMHE) est le seul représentant de la famille des ellipticines utilisés actuellement en thérapeutique anticancéreuse. C'est un agent intercalant dont la seule indication est le cancer du sein métastasé, (malgré son activité antitumorale supérieure à celle de l'adriamycine sur les cancers du rein et les cancers du poumon à petites cellules ou non⁷⁷). Sur le plan toxicologique, ce médicament peut provoquer une toxicité rénale cumulative et dose-dépendante caractérisée par des lésions tubulaires interstitielles et des nécroses tubulaires proximales, évolutives et irréversibles.

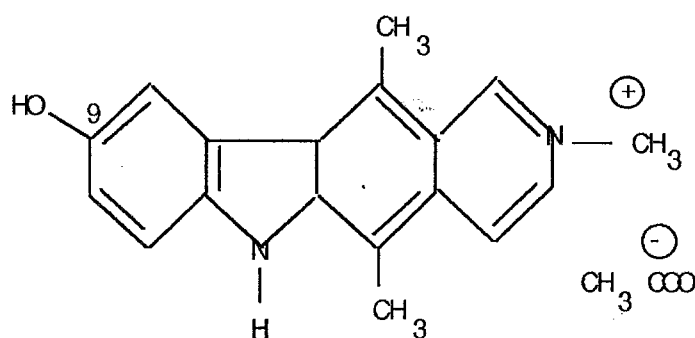


Fig. 10 : Structure de l'acétate d'elliptinium

Auclair et coll.⁷⁸ rapportent que le celliptium (9-hydroxyellipticine) peut subir une autoxydation spontanée au niveau du groupement hydroxyle en position 9 pour donner du peroxyde d'hydrogène et une quinone imine 9-oxoellipticine (NMOE). Les expériences en RPE utilisant le DMPO ont montré que la réaction initiale consiste en

⁷⁴Seigel D., Gibson N.W., Ross D. (1990) Metabolism of mitomycin C by DT-diaphorase, role in mitomycin induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, 50, 7483-7489.

⁷⁵Dulhanty A.M., Whitmore G.F. (1991) Chinese hamster ovary cell lines resistant to mitomycin C under aerobic but not hypoxic conditions are deficient in DT-diaphorase. *Cancer Res.*, 51, 1860-1865.

⁷⁶Bligh H.F., Bartoszc A., Robson C.N., Hickson I.D. (1990) Activation of mitomycin C by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Cancer Res.*, 50, 7789-7792.

⁷⁷Artega CL, Kisner DL, Goodman A, Von Hoff DD, (1987) Elliptinium, a DNA agent with broad antitumor activity in a human tumor cloning system. *Eur.J. Cancer Clin. Oncol.*, 23, 1621-25.

⁷⁸Auclair C., Hyland K., Paoletti C. (1983) Autoxidation of the antitumor drug 9-hydroxyellipticine and its derivatives. *J. Med. Chem.*, 26, 1438-1444

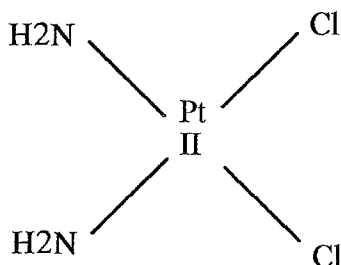
un transfert d'électron de la drogue vers l'oxygène moléculaire pour former le radical superoxyde. Ce processus serait à l'origine de l'apparition de la forme active de la drogue et des espèces toxiques de l'oxygène, ce qui expliquerait en partie le mécanisme d'action biochimique *in vivo* de cette drogue.

Les composés excrétés dans les urines chez l'homme après traitement à l'ellipticine sont constitués de la drogue inchangée accompagnée de dérivés sulfo-conjugués démontrant indirectement la présence d'une forme intermédiaire oxydée de la molécule *in vivo*, qui est la quinone imine N-méthyl -9- oxoelliptinium⁷⁹. Ces composés n'ont pas été retrouvés au niveau de la bile⁸⁰. Cela laisse penser que le processus d'activation a lieu au niveau des cellules rénales et non pas dans le foie.

Les processus oxydatifs d'activation de l'ellipticine et la formation de radicaux oxygénés ont été mis en cause par Dadoun et coll.⁸¹ dans la toxicité rénale de l'ellipticine et ce, via la stimulation de la peroxydation des lipides membranaires. Ils ont, en effet, observé une augmentation importante d'hydroperoxydes organiques, de malondialdéhyde et d'acide gras non esterifiés au niveau du cortex rénal de rats traités au celliptium par rapport aux rats témoins. De la même manière, Thomas et coll.⁸² ont démontré une nette augmentation du 4-hydroxynonéal et du malondialdéhyde.

7. LE CYSPLATINE (CDDP).

C'est un composé complexe du platine II : Cis diaminodichloroplatine (CDDP)



⁷⁹Monsarrat B., Maftouh M., Meunier G. (1987) oxidative biotransformation of the antitumor agent elliptinium acetate. Structural characterization of its human and rat urinary metabolite. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 5, 341-345.

⁸⁰Maftouh M., Amiar Y., Picard F. C. (1985) Metabolism of the antitumor drug N2-methyl-9-hydroxyellipticinium acetate in isolated rat kidney cells. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 427.

⁸¹Dadoun C., Viotte G.R. (1990) Celliptium induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rat renal cortex. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 27, 178-186.

⁸²Thomas N., Viotte G.R., Rothender M.D., Eserbauer H., Fillastre J.P. (1991) Time course study of lipid peroxidation induced by N2-methyl-9-hydroxyellipticinium acetate or Celliptium in rat renal cortex. *Pharmacol. Toxicol.*, 69, 112-116.

L'ion divalent platine est lié à deux atomes de chlore et 2 groupements NH₃ en position cis. Les ions chlore, en milieu aqueux, sont déplacés, générant un complexe hydrate, positivement chargé et fortement nucléophile. Ce complexe va interagir avec l'ADN et l'ARN ou avec des protéines pour former des liaisons covalentes bifonctionnelles.

L'isomère trans ne présente pas d'activité antitumorale.

Le cisplatine est un anticancéreux majeur utilisé en polychimiothérapie dans de nombreuses tumeurs (testicules, ovaires, col de l'utérus, sphère ORL, oesophage, vessie).

L'utilisation du cisplatine en clinique est caractérisée par la survenue d'une toxicité rénale quasi-constante aux doses élevées. Cette toxicité serait due à des phénomènes peroxydatifs liés soit à un mécanisme direct de production de radicaux libres de l'oxygène, soit à des altérations au niveau des mécanismes naturels de protection contre ces radicaux.

McGinness et coll.⁸³ ont montré que l'administration d'antioxydants et de scavengers, tels que la superoxyde dismutase, l'O-(B-hydroxyethyl)-rutoside, N,N-diphényl-p-phénylène diamine (DPPD) ou l' α tocophérol, protègent les reins de la toxicité induite par le cisplatine. L'effet de certains scavengers chez des rats traités par le cisplatine a été également testé par Hannemann et coll.⁸⁴. Ils ont, quant à eux, montré une inhibition significative de la production de MDA chez les rats traités mais recevant les antioxydants par rapport aux rats traités au cisplatine. Ils ont également observé une réduction des altérations histologiques apparentes observées au niveau des reins. En outre, la production du peroxyde d'hydrogène et du radical superoxyde par les macrophages, est significativement augmentée après traitement par le CDDP⁸⁵.

D'autres auteurs^{86,87} ont montré que le cisplatine induit une diminution du cytochrome P-450, de l'activité glutathion S-transférase, de l'activité glutathion peroxydase et de certaines activités catalytiques spécifiques cytochrome P-450

⁸³McGinness J.E., Proctor P.H., Demopoulos G.A. (1978) Amelioration of cis platinum induced nephrotoxicity by orgotéin (Superoxyde dismutase). *Physiol.Chem. Phys.*, 10, 267-272.

⁸⁴Hannemann J., Baumann K. (1988) Ciplatin-induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney : Different effects of antioxidants and radical scavengers. *Toxicology*, 51, 119-132.

⁸⁵Sodhi A., Gupta P. (1986) Increased release of hydrogen peroxyde and superoxide anion by murine macrophage in vitro after cisplatin treatment. *Int. J. Immunopharmacol.*, 8, 709.

⁸⁶Bompart G. (1989) Cisplatin-induced changes in cytochrome P-450, lipid peroxidation and drug-metabolizing enzyme activities in rat kidney cortex. *Toxicol. Lett.*, 48, 193-199.

⁸⁷Bompart G. (1990) Cisplatin-induced changes on cytochromes P-450, lipid peroxidation and some P-450 related specific catalytic activities in rat liver. *J. Toxicol. Clin. Exp.*, 10(6), 375-383.

dépendantes, ainsi que la peroxydation des lipides au niveau des microsomes hépatiques et rénaux.

L'interaction du cisplatine avec les groupements SH entraîne des perturbations au niveau du métabolisme de certains composés, tels que le glutathion et les métallothionéines⁸⁸.

Il a été également suggéré que le mécanisme de la toxicité rénale du cisplatine soit semblable à celui de la céphaloridine, sachant que la toxicité de cette dernière est initiée par la production du radical superoxyde à partir d'un cycle redox au niveau des microsomes.

Or, il n'existe pas de preuves directes de cette production, et le mécanisme exact de la toxicité du cisplatine, malgré toutes les observations rapportées ci-dessus, est loin d'être complètement élucidé.

8. L'ETOPOSIDE (VP-16).

L'étoposide ou le VP-16 est un anticancéreux de la famille des épipodophyllotoxines qui agit essentiellement par le biais de la topoisomérase II dont il stabilise le complexe formé avec l'ADN.

Il est utilisé dans de nombreux protocoles de chimiothérapie et en particulier : cancer du poumon à petites cellules, cancer du rein, tumeurs embryonnaires, neuroblastomes, lymphomes et leucémies.

⁸⁸Poupon J. Cisplatinium and free radicals. Comptes rendus du 4th International Congress on Trace Elements in Medicine and Biology. Trace elements and free radicals in oxydative diseases, Chamonix: April 5th-9th, 1993

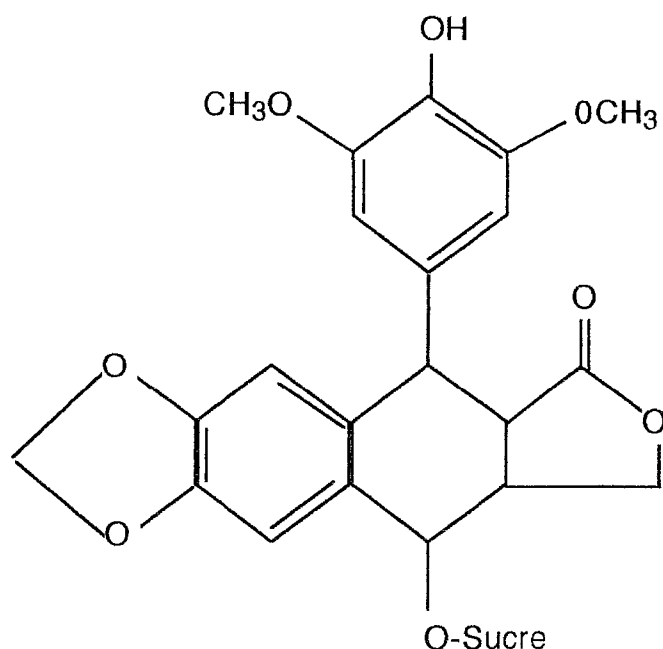


Fig. 11 : structure chimique du VP-16.

En plus de l'action par l'intermédiaire de la topoisomérase II, le mécanisme d'action de l'étoposide semble également impliquer une activation métabolique en produits réactifs capables de provoquer des dommages au niveau de l'ADN.

Le VP-16 peut en effet, subir une métabolisation via des systèmes d'oxydoréduction P-450 dépendants ou par le biais des prostaglandines synthétases et des myéloperoxydases, en intermédiaires ortho-quinoniques qui se lient de façon beaucoup plus forte que la molécule mère aux protéines microsomales, ainsi qu'à l'ADN⁸⁹.

En plus de l'ortho-quinone, il y a également formation du radical semiquinone après réduction à un électron de l'étoposide ou de son métabolite o-deméthylé. Celui-ci pourrait être un intermédiaire important dans le métabolisme de l'étoposide. Comparé à l'orthoquinone, le radical semiquinone réagit de manière différente avec l'ADN et y induit d'autres types de lésions. Par conséquent, il participerait pour une part importante dans la cytotoxicité de la drogue⁹⁰.

En effet, une fois formé, le radical semiquinone peut subir une réduction pour redonner la forme quinone parallèlement à la formation de radicaux superoxydes. Il peut également induire la formation de radicaux hydroxyles directement, en présence de

⁸⁹Mans D.R.A., Lafleur M.V.M., Westmijze E.J., VanMaanen J.M.S. (1991) Formation of different reaction products with single and double stranded DNA by the ortho-quinones and the semiquinone free radical of etoposide (VP-16-223) *Biochem. Pharmacol.*, 11(42), 2131-2139.

⁹⁰Haim N., Nemec J., Roman J., Sinha B.K. (1987) In vitro metabolism of etoposide by liver microsomes and irreversible binding of reactive intermediates to microsomal proteins. *Biochem. Pharmacol.*, 4(36), 527-537.

métaux redox et du peroxyde d'hydrogène. La production de radicaux $^{\circ}\text{OH}$ est mise en évidence par l'individualisation du spectre caractéristique du DMPO-OH en résonance paramagnétique électronique.⁹¹

⁹¹Powis G., Hodnett E.M., Santone K.S., Lee See K., Medler D.C. (1987) The role of metabolism and redox cycling in the cytotoxicity of antitumor quinones, quinoneimines, and quinondiimines. *Cancer Res.*, 47, 2363-2370.

CONCLUSION

1. INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation de l'adriamycine en chimiothérapie anticancéreuse est limitée par la cardiotoxicité dose-dépendante et cumulative qu'elle peut entraîner. L'incidence de cette cardiotoxicité augmente considérablement chez les patients recevant des doses d'adriamycine supérieures à 550 mg/m².

Plusieurs études sur la pharmacologie moléculaire de l'adriamycine ont révélé que ce dérivé anthracyclinique peut accepter un électron par l'intermédiaire de la NADPH cytochrome P-450 réductase pour former un radical semiquinone. Ce dernier peut à son tour réduire l'oxygène moléculaire en radical superoxyde qui peut alors, initier la formation d'autres radicaux oxygénés plus toxiques tel que le radical hydroxyle. La production d'espèces réactives de l'oxygène par l'adriamycine est susceptible de stimuler le processus peroxydatif dans les membranes cellulaires.

La toxicité de l'adriamycine résulterait, donc, de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ceux-ci entraîneraient d'une part, la peroxydation des lipides, la désintégration du réticulum endoplasmique et des membranes mitochondriales⁵⁷, d'autre part, l'inhibition d'enzymes vitales pour les cellules⁴⁹, et enfin, l'attaque des acides nucléiques⁴⁶.

La littérature abonde en matière de travaux mettant en cause les phénomènes peroxydatifs comme responsables de la toxicité cardiaque de l'adriamycine⁵⁶. Cependant, les mécanismes biochimiques et la nature exacte des ERO impliqués dans ce phénomène restent matière à beaucoup de controverses. Nous avons entrepris ce travail pour mieux cerner les mécanismes biochimiques du processus peroxydatif adriamycine-dépendant dans les microsomes hépatiques de rat, en évaluant deux marqueurs de la peroxydation lipidique: le malondialdéhyde et les hydroperoxydes organiques, et en étudiant l'effet de certains antioxydants sur cette peroxydation.

2. MATERIEL ET METHODES.

2.1. LE MODELE EXPERIMENTAL : Les microsomes hépatiques.

Les microsomes sont des fractions cellulaires constituées d'un mélange de réticulum endoplasmique rugueux (i.e, réticulum avec ribosomes) et des ribosomes libres⁹². Différents types d'activités enzymatiques, impliquées dans le métabolisme des médicaments et leur activation, sont présentes dans la fraction microsomale des cellules hépatiques, en particulier, les enzymes du système cytochromes P-450 tel que les NADPH cytochrome P-450 oxydo-réductases.

2.1.1. Préparation des microsomes hépatiques de rat.

La méthode classique de séparation des microsomes est basée sur l'ultracentrifugation différentielle.

Parmi les autres méthodes développées, on peut citer la précipitation acide, et la filtration sur gel. Ces deux techniques ont l'inconvénient d'inactiver certaines enzymes microsomales tel que le cytochrome P-450, la glucose 6-phosphatase, et la NADH cytochrome b5 réductase.

Après avoir essayé plusieurs modes de préparations évoquées dans la littérature, nous avons retenu, la méthode décrite ci-dessous, basée sur une ultracentrifugation différentielle.

Matériel :

- Ultracentrifugeuse Beckman réfrigérée : rotor 40
- Tubes en polycarbonate et homogénéisateur Potter

Méthode :

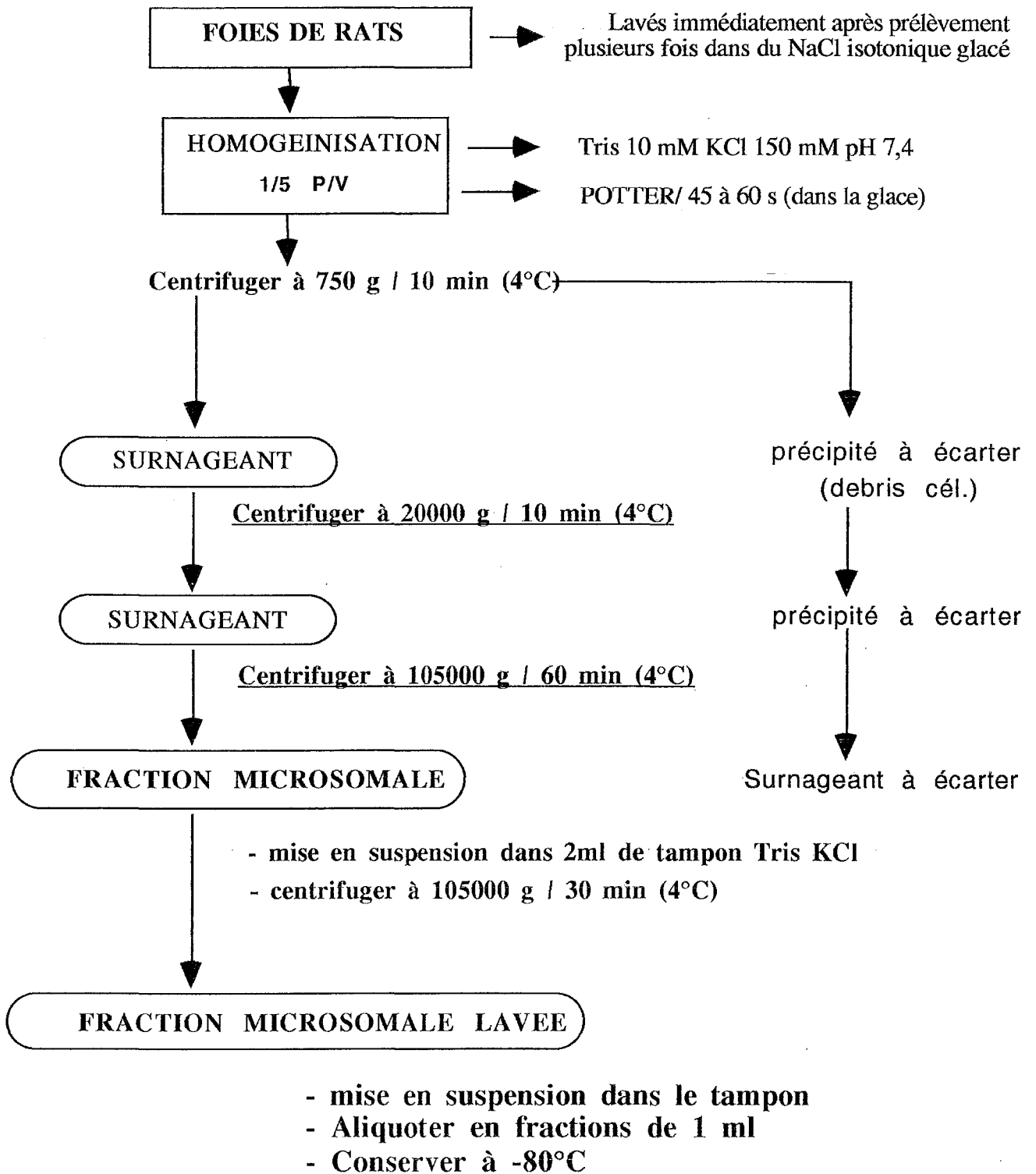
Les rats, à jeun depuis 18 heures, sont décapités, et les foies immédiatement prélevés puis lavés trois à quatre fois dans du sérum physiologique glacé pour éliminer la plupart des globules rouges.

Les foies sont alors pesés, dilués dans un tampon Tris 10 mM, KCl 150 mM pH 7,4 au 1/5 (P/V), puis homogénéisés au potter, dans la glace, pendant 45 à 60 secondes.

⁹²Murray R.K., Biomolécules et méthodes biochimiques. In Granner DK., Mayer P.A., Murray R.K., Rodwell V.W. Précis de biochimie 7 éd. les presses de l'université laval 1992, p. 4-12.

L'homogénat est ensuite centrifugé à 750 g pendant 10 min, le culot formé de globules rouges et de débris et noyaux cellulaires est éliminé. Le surnageant est centrifugé pendant 10 min à 20.000g à +4°C. Le culot constitué de la fraction mitochondriale (contenant les mitochondries, les lysosomes, et les peroxysomes) est éliminé et le surnageant centrifugé à 105.000g pendant une heure à +4°C. Le surnageant cytosolique obtenu ensuite, est éliminé, et le culot, qui correspond à la fraction microsomale, est ressuspendu dans le tampon puis recentrifugé à 105.000g pendant 30 min. Le surnageant est écarté. La fraction microsomale lavée est finalement remise en suspension dans le tampon, aliquotée, et conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

ETAPES PREPARATIVES DES MICROSOMES HEPATIQUES



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

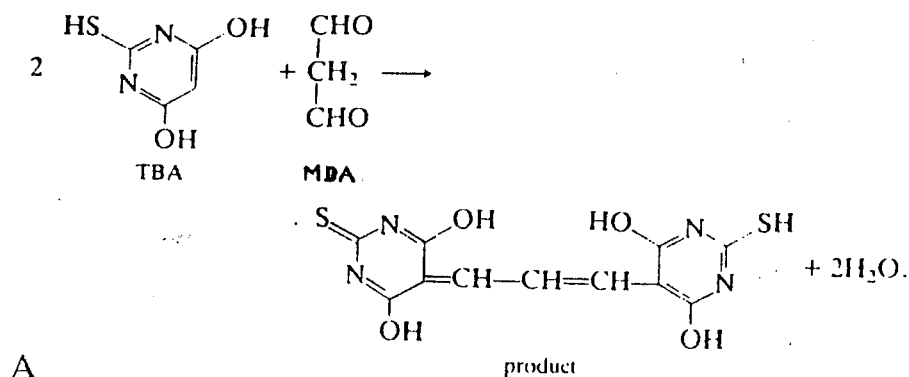
Comme nous l'avons vu dans le chapitre concernant les radicaux libres, il existe plusieurs méthodes permettant l'évaluation de la peroxydation lipidique *in vitro*.

Nous avons retenu dans ce travail deux paramètres : Le malondialdéhyde (MDA) et les hydroperoxydes organiques (HPO).

2.2.1. Techniques de dosages et conditions opératoires.

2.2.1.1. MDA

Le MDA est un produit de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés avec au moins trois doubles liaisons. Les fonctions aldéhydiques du MDA réagissent avec l'acide thiobarbiturique selon la réaction A pour donner un complexe coloré rose dont la longueur d'onde d'absorption maximale est 532 nm. Les techniques de dosages spectrophotométriques ou fluorométriques étant sujettes à de nombreuses interférences, nous avons choisi la méthode chromatographie liquide haute performance qui reste par ailleurs, la méthode de choix pour ce dosage⁹³.



⁹³Richard M.J., Guiraud P., Meo J., Favier A. (1992) High performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials using a commercially available reagent. *J. Chromatogr.*, 577, 9-18.

Matériel :

- Colonne (15 cm, Φ 4,6 mm), phase ODS hypersil C18, 5 μ m.
- Précolonne RP18 - 10 μ m.
- Colorimètre Kontron (détection à 532 nm).
- Programme utilisé: - Débit de 1 ml/min.
 - Lecture à 100 mV pleine échelle.

Le tampon d'élution est préparé à partir de méthanol et d'un tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ 50 mM pH 6,0.

La phase mobile est constituée par le mélange phosphate / méthanol (58/42 ; V/V)

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

La courbe de calibration est obtenue à partir d'une solution de 1.1.3.3 tétraéthoxypropane (TEP) (0 à 40 μ mol/l).

Méthode :

A 100 μ l du mélange réactionnel (microsomes, Adriamycine, NADPH, dans du tampon Tris 10 mM, KCl 150 mM, pH 7,4), ou de point de gamme on ajoute 750 μ l de solution de travail (TBA + acide perchlorique dans le rapport 2V/1V) contenant 20 μ l de BHT éthanolique 2% pour 980 μ l de solution de travail.

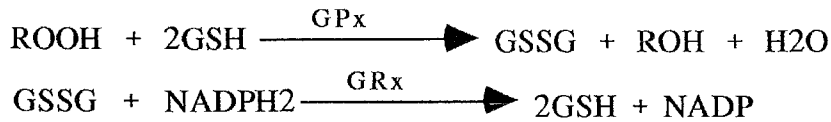
Après 60 min d'incubation à 95 °C, les tubes sont refroidis et les mélanges réactionnels neutralisés par un tampon phosphate disodium 200 mM pH 11,5 avant d'être injectés en HPLC.

2.2.1.2. HPO.

La technique de dosage des hydroperoxydes utilisée fait appel à une méthode enzymatique de dosage de substrats décrite par Heath et Tappel⁹⁴, modifiée et adaptée par nous mêmes⁹⁵. Elle utilise l'action conjointe de deux enzymes : la glutathion peroxydase et la glutathion réductase selon les réactions suivantes :

⁹⁴Heath R. Tappel A. (1976) A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. Anal. Biochem., 76, 184)-191.

⁹⁵Hida H. DEA de génie biologique et médical. Mise au point d'une méthode de dosage des hydroperoxydes organiques plasmatique. Université Claude Bernard. Lyon 1991.



Méthode

Dans une microcuvette on introduit successivement :

- 800 µl de tampon Tris 150mM Na₄EDTA 0,2 mM, pH 7,5.
- 100 µl du mélange réactionnel ou de point de gamme utilisant du *tert*-butyl hydroperoxyde (tBOOH).

Chaque dosage est effectué en parallèle avec un témoin.

Après 5 min à température ambiante on rajoute dans la cuve dosage :

- 50 µL de NADPH 2 mM
- 10 µl de GPX 20 U/ml
- 100 µl de glutathion 4,25 mM

et dans la cuve témoin 160 µl de tampon.

On mélange et on incube 15 min à température ambiante, puis on fait une première lecture de DO à 340 nm (DO_{d1} et DO_{t1}).

On ajoute ensuite 10 µl de GRX à 200 U/ml dans les cuves dosage et gamme et 10 µl de tampon dans les cuves témoins.

On incube 15 min à température ambiante, puis on fait une deuxième lecture de DO à 340 nm (DO_{d2} et DO_{t2}).

On trace la droite de la gamme DO = DO₁ - DO₂ en fonction de la concentration en tBOOH et les résultats en HPO des dosages sont obtenus par report de la valeur de (DO_{d1} - DO_{d2}) - (DO_{t1} - DO_{t2}) sur la gamme d'étalonnage..

Le taux de protéines est mesuré par la méthode de Lowry⁹⁶.

Les résultats sont exprimés en nmol de MDA ou d'HPO /mg de protéines microsomales.

2.2.2. Choix des conditions opératoires (détermination de la concentration optimale en NADPH et en protéines microsomales).

La peroxydation microsomale induite par l'adriamycine nécessite la présence dans le milieu réactionnel d'un donneur d'électron, qui est le NADPH.

⁹⁶Lowry O.H., Rosbrough, N.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265.

Nous avons donc déterminé la concentration optimale de NADPH dans la peroxydation microsomale en présence d'une concentration constante d'adriamycine (25 μM) et après une incubation de 60 minutes à 37°C (la peroxydation est évaluée ici par le dosage des MDA).

De la même manière, nous avons déterminé la concentration en protéines microsomales optimale dans cette étude.

2.2.3. Etude de la peroxydation lipidique microsomale induite par l'Adriamycine.

Les microsomes hépatiques (1 mg de protéines/ml) sont incubés en présence d'adriamycine aux concentrations de 0, 25, 50, 100, 200, et 300 μM dans le tampon Tris 10 mM, KCl 150 mM, pH 7,4. Les dosages des HPO et des MDA sont réalisés immédiatement (T0) et après 15 et 60 minutes d'incubation à 37°C à l'abri de la lumière.

Les réactions sont initiées par l'ajout de NADPH 2,5 mM. Le volume final d'incubation est de 1 ml pour chaque essai.

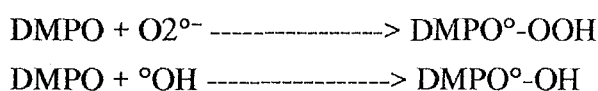
2.3. DETECTION PAR RPE DES FORMES ACTIVES DE L'OXYGENE PRODUITES PAR L'ADRIAMYCINE.

Caractérisé par le moment magnétique de son électron célibataire, un radical devient détectable par résonance para électronique. Cela dit, la détection des radicaux oxygénés dans les milieux biologiques est impossible à cause de leur forte réactivité et de leur demi-vie courte.

L'utilisation d'un piègeur de spin permet de contourner cette difficulté. En effet, le radical libéré en solution est capté par un piègeur de spin avec lequel il forme un dérivé radicalaire relativement stable et de demi-vie assez longue pour être détectable.

Nous avons utilisé dans ce test le 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde (DMPO) comme piègeur de spin.

Il permet la détection des radicaux superoxydes et des radicaux hydroxyles :



Matériel :

- Spectromètre RPE BRUKER
- Micropipettes pasteur

Méthode:

Le mélange réactionnel est constitué de microsomes hépatique (1 mg de protéines /ml) et d'adriamycine aux concentrations de 25 et de 250 μ M dans du tampon Tris 10 mM, KCl 150 mM pH 7,4.

La réaction est déclenchée par du NADPH (concentration finale = 2,5 mM).

Le DMPO purifié par distillation est utilisé immédiatement après décongélation.

Il est ajouté au mélange réactionnel instantanément après le déclenchement de la réaction (Concentration finale = 500 mM). Le signal RPE est enregistré immédiatement puis 5 min et 10 min après à température ambiante.

2.4. ETUDE DE L' EFFET DES ANTIOXYDANTS SUR LA PEROXYDATION INDUITE PAR L'ADRIAMYCINE.

Dans le but d'élucider le mécanisme d'action peroxydatif et de déterminer les espèces réactives de l'oxygène formées, nous avons étudié l'effet de certains antioxydants sur la peroxydation microsomale adriamycine-dépendante.

2.4.1. Effet des antioxydants sur la production de MDA

Les substances testées sont : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la superoxyde dismutase et la catalase conjointement, la vitamine E, le glutathion réduit, la désferal, le zinc, le sélénium, et le mannitol.

Ces substances sont ajoutées au mélange réactionnel décrit ci-dessus (microsomes 1mg de protéines/ml, NADPH 2,5 mM) à des concentrations variables. Les essais de peroxydation sont effectués en présence et en absence d'adriamycine (25 μ M) après 60 minutes d'incubation à 37°C.

2.4.2. Effet des antioxydants sur la production d'HPO.

Les substances testées dans ce cas sont la superoxyde dismutase, la catalase ainsi que la SOD et catalase apportés conjointement au mélange réactionnel.

Les HPO sont mesurés en présence et en absence de 250 μ M d'adriamycine après 15 minutes d'incubation à 37°C.

3. RESULTATS.

3.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS OPERATOIRES.

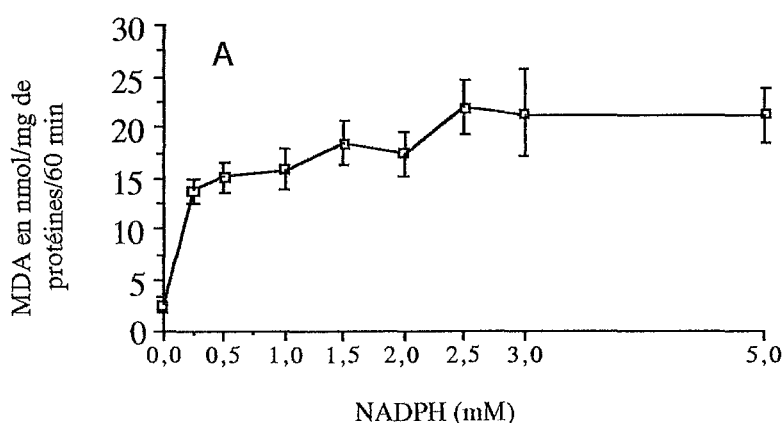
3.1.1. Choix de la concentration en NADPH.

La peroxydation microsomale induite par l'adriamycine nécessite la présence dans le mélange réactionnel d'une quantité adéquate de NADPH. Etant donnée la variabilité des valeurs retrouvées dans la littérature (0,5 à 10 mM selon les auteurs), nous avons déterminé la concentration optimale de NADPH nécessaire pour obtenir une production maximale de MDA par 25 μ M d'adriamycine dans une suspension de microsomes fixée à 1 mg de protéines par ml. Le dosage de MDA est réalisé après 60 min d'incubation à 37°C.

La concentration de NADPH retenue pour l'ensemble des manipulations à suivre est de 2,5 mM (en concentration finale) (fig.12A).

3.1.2. Choix de la concentration en protéines microsomales.

Dans les conditions décrites ci-dessus (en présence de 2,5 μ M de NADPH), la peroxydation est maximale pour un taux de protéines microsomales compris entre 0,8 et 1,2 mg/ml (Fig 12 B)



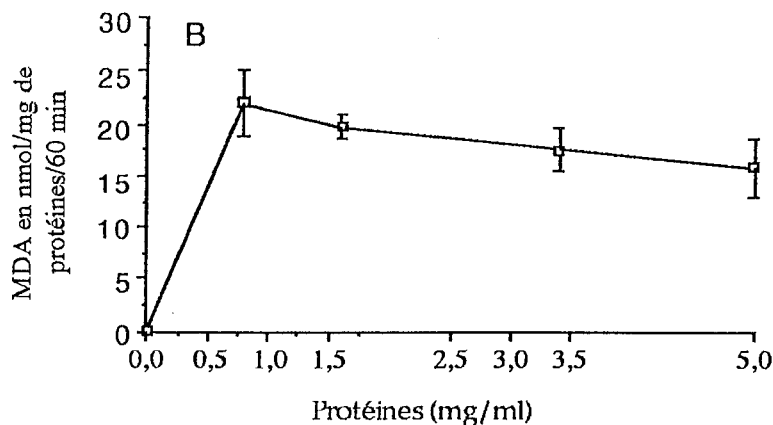


Fig. 12 : Effet de la variation des concentrations en NADPH (A), et en protéines microsomales (B) sur la peroxydation induite par 25 μ M d'adriamycine. La peroxydation lipidique est mesurée par le taux de MDA après 60 min d'incubation à 37°C. Chaque point est la moyenne de 3 à 4 dosages \pm la déviation standard.

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

3.2.1. Production de MDA.

L'incubation des microsomes hépatiques de rats avec du NADPH, génère autour de 5 nmol de MDA/mg de protéines au bout de 60 min d'incubation. Ce taux de MDA est 4 fois supérieur en présence de 25 μ M d'adriamycine. Cependant, la production de MDA n'est pas proportionnelle à la concentration en adriamycine. En effet, les fortes concentrations d'adriamycine (supérieures à 200 μ M) ne produisent aucun effet par rapport aux témoins sans adriamycine (Fig 13).

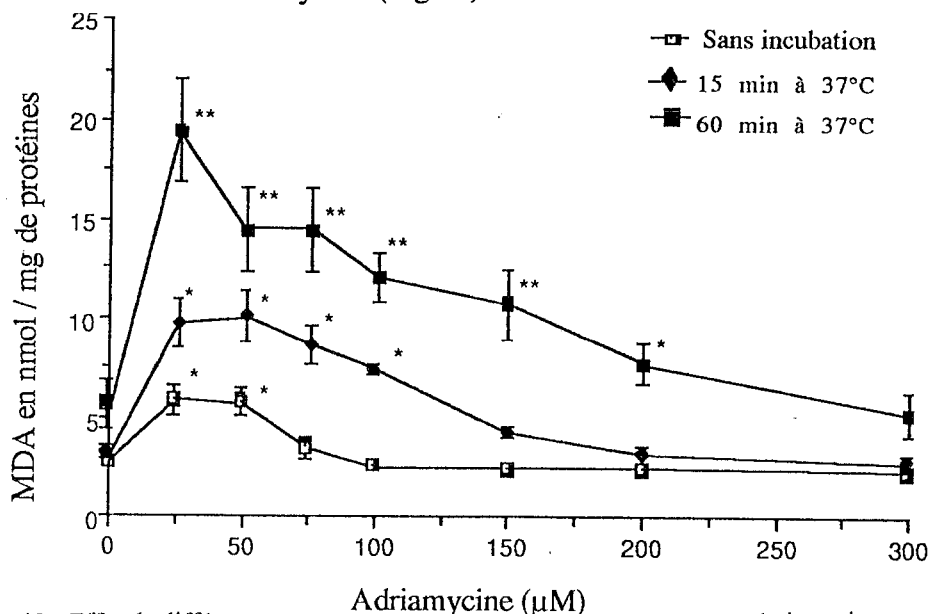


Fig. 13 : Effet de différentes concentrations d'adriamycine sur la peroxydation microsomale, sans incubation puis après 15 et 60 min à 37°C. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard de 3 à 5 expériences. (MDA sans adriamycine ni NADPH : sans incubation, $0,33 \pm 0,06$. 15 min. d'incubation, $0,6 \pm 0,048$. 60 min. d'incubation, $2,2 \pm 0,36$.)

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, par rapport au témoin sans adriamycine (Student t.)

3.2.2. Production des HPO

Le taux d'hydroperoxydes organiques formés dans les mêmes conditions d'incubation est proportionnel à la quantité d'adriamycine présente dans le milieu. Il atteint un plateau aux alentours de 200 μM d'adriamycine. Ces hydroperoxydes sont produits très rapidement après le déclenchement du processus peroxydatif, sans qu'il soit nécessaire d'incuber le mélange à 37°C. (Fig. 14).

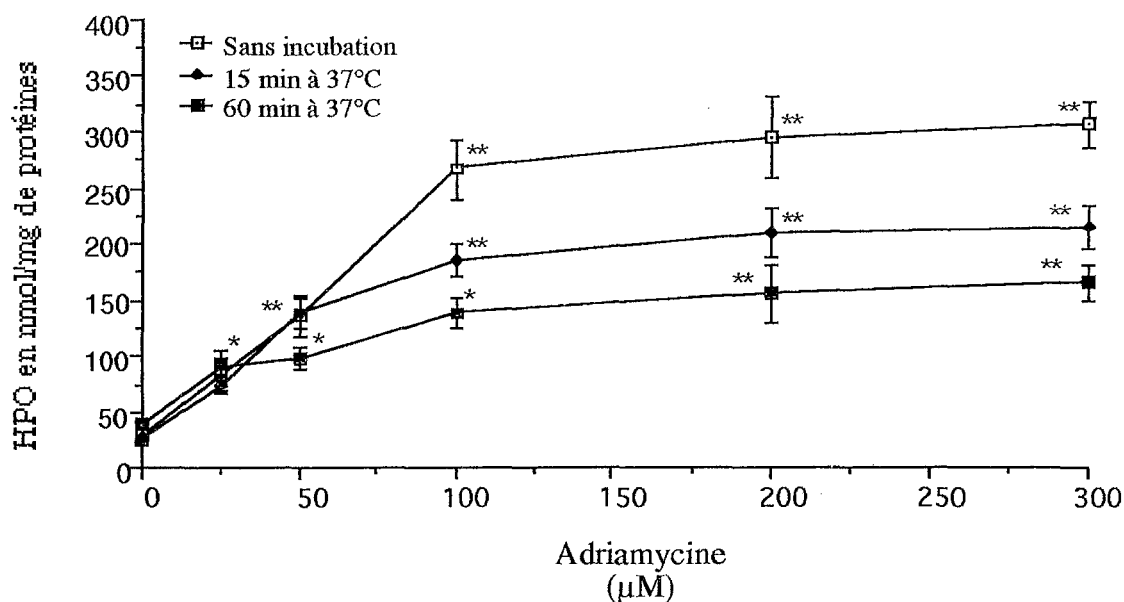


Fig.14 : Effet de différentes concentrations d'adriamycine sur la peroxydation microsomale, sans incubation puis après 15 et 60 min à 37°C. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard de 3 à 5 expériences .

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ par rapport au témoin sans adriamycine (Student t).

3.3. DETECTION PAR RPE DES FORMES ACTIVES DE L'OXYGENE PRODUITES DANS LES MICROSOMES PAR L'ADRIAMYCINE.

Lors de l'incubation des microsomes hépatiques avec du NADPH et de l' adriamycine en présence de DMPO, nous obtenons les spectres RPE présentés dans les figures 15 et 16.

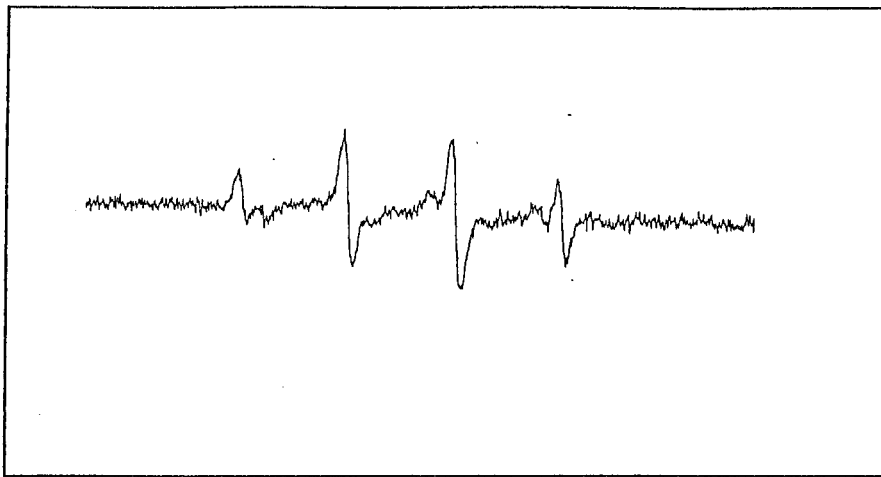
Ces tracés sont caractéristiques du spin adduit DMPO-OH. Ils reflètent donc, la formation de radicaux hydroxyles dans le milieu réactionnel.

Le spectre obtenu en absence d'adriamycine (Fig. 15, spectre A) montre que c'est le métabolisme de l'adriamycine qui est responsable de la production des radicaux $^{\circ}\text{OH}$ observés.

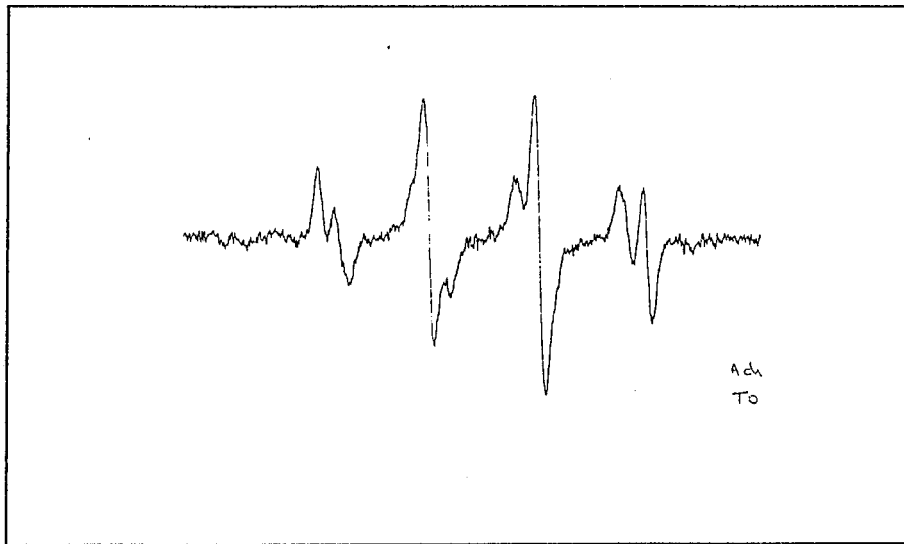
Quelle que soit la concentration d'adriamycine mise en jeu, les radicaux formés sont de type hydroxyle avec un spin adduit de DMP-OH caractéristique. L'amplitude du signal obtenu, qui reflète la quantité de radicaux formés, montre que la production de ces radicaux (hydroxyles) est beaucoup plus importante avec 250 μM d'adriamycine qu'avec 25 μM .(Fig. 15, spectres B et C).

Nous observons également un signal correspondant au spin adduit DMPO-OOH qui traduit la formation de radicaux superoxydes dans le milieu réactionnel.

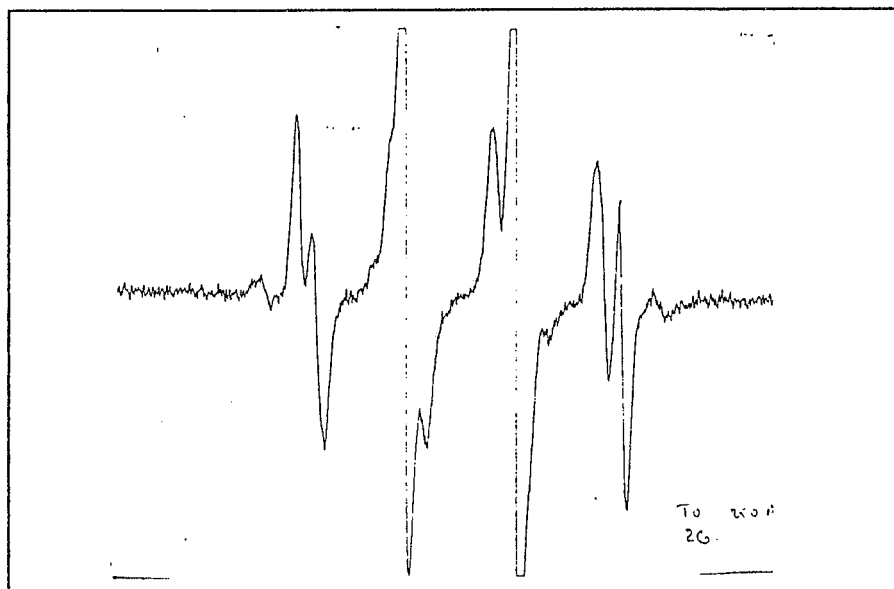
L'adduit de DMPO-OOH est de très faible intensité, et il tend à s'atténuer au cours du temps, au profit de l'adduit du DMPO-OH dont le signal croit en fonction du temps d'incubation de l'adriamycine avec les microsomes .(Fig.16).



A : Adriamycine 0 μM

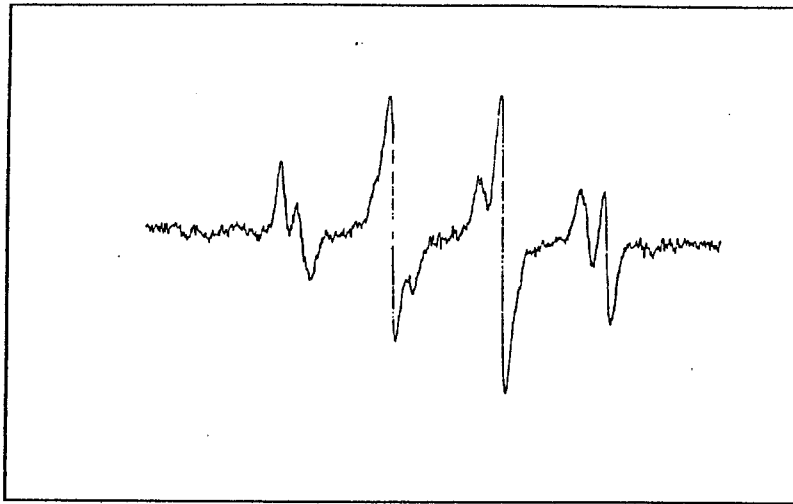


B : Adriamycine 25 μM

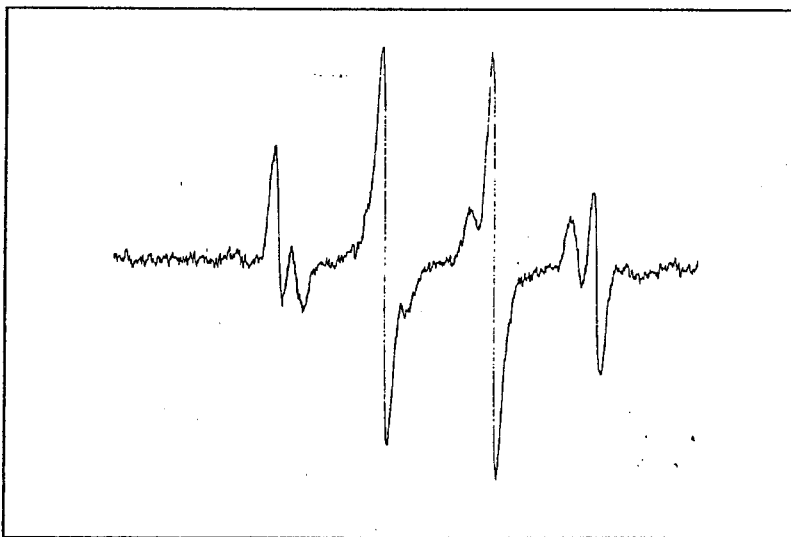


C : Adriamycine 250 μM

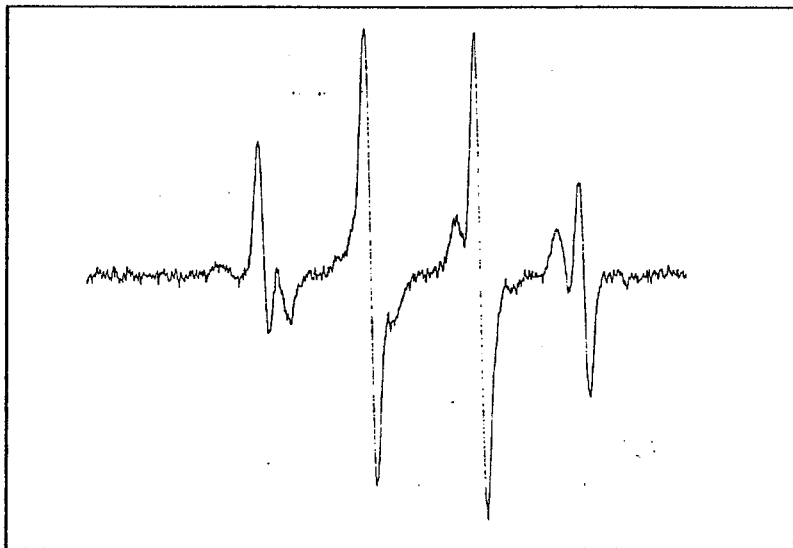
Fig. 15 : Spectres RPE d'un mélange constitué de microsomes hépatiques (1 mg de protéines / ml) et de NADPH 2,5 mM en absence (A) et en présence (B, C) l'adriamycine (25 et 250 μM)
Les spectres sont enregistrés immédiatement après constitution du mélange en présence de 500 mM de DMPO.



Adriamycine 25 μ M, T0



Adriamycine 25 μ M, T 5 min



Adriamycine 25 μ M, T10 min.

Fig. 16 : Spectres RPE d'un mélange constitué de microsomes hépatiques (1 mg de protéines par ml) et de NADPH 2,5 mM en présence de 25 μ M d'adriamycine.
Les spectres sont enregistrés immédiatement après constitution du mélange (T0), puis 5 et 10 min après (T 5min. et T 10 min.)

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

Nous avons évalué, dans cette partie, l'effet de certains antioxydants, enzymatiques ou non, sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine.

La concentration d'adriamycine choisie pour effectuer les tests est de 25 μ M pour les tests au TBA (dosage des MDA) et de 250 μ M pour les tests basés sur le dosage des HPO. Dans le premier cas, le mélange réactionnel est incubé pendant 60 min à 37°C avant le dosage, et dans le deuxième cas, le temps d'incubation est de 15 min.

3.4.1. Effet de la SOD et de la catalase.

3.4.1.1. Sur la production de MDA.

La production du radical superoxyde par le radical semiquinone après incubation avec les microsomes hépatiques a été largement étudiée.

La superoxyde dismutase, qui permet la dismutation de ce radical en peroxyde d'hydrogène, inhibe de façon très modérée la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine (Fig. 17). Celle-ci produisant un pourcentage d'inhibition équivalent, que ce soit à de fortes ou à de faibles concentrations (60 à 300 U/ml).

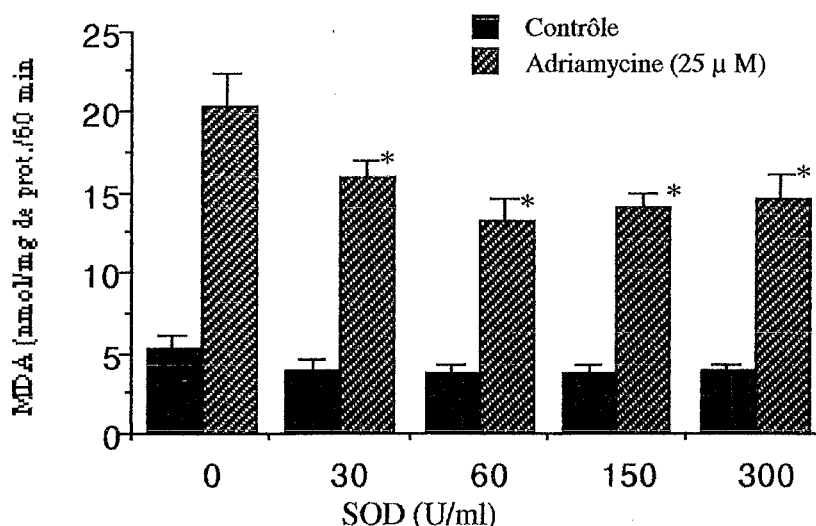


Fig 17 : Effet de la SOD sur la production de MDA dans les microsomes hépatiques en présence, et en absence de 25 μ M d'adriamycine. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard de 3 expériences.

* $p < 0,05$ par rapport au témoin sans SOD (Student t.).

Aucun effet n'est en revanche, observé en présence de la catalase par rapport au témoin sans catalase sur la production de MDA par l'adriamycine (Fig. 18).

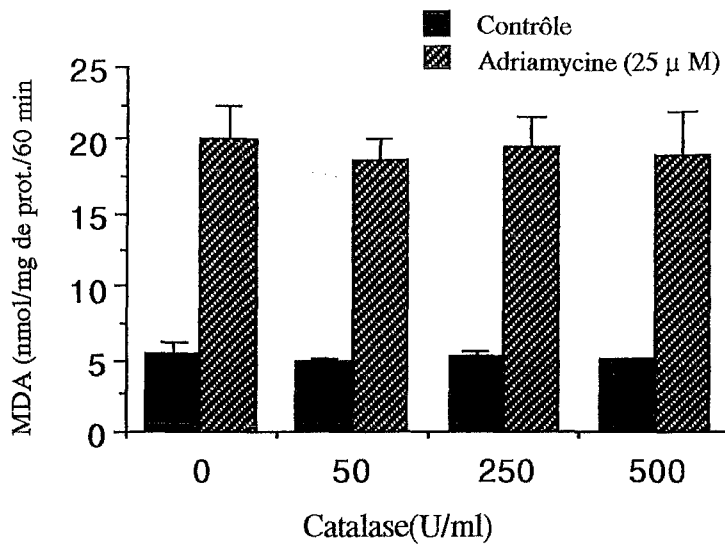


Fig. 18 : Effet de la catalase sur la production de MDA dans les microsomes hépatiques en présence, et en absence de 25 μM d'adriamycine. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± la déviation standard de 3 expériences .

L'incubation du mélange réactionnel en présence des deux enzymes simultanément, (SOD + catalase) produit un effet plus important sur la production de MDA par rapport à la SOD seule. Le pourcentage d'inhibition dans ces conditions est supérieur à 25% avec des concentration de SOD et de catalase respectivement de 300 et 200 U/ml (Fig. 19)

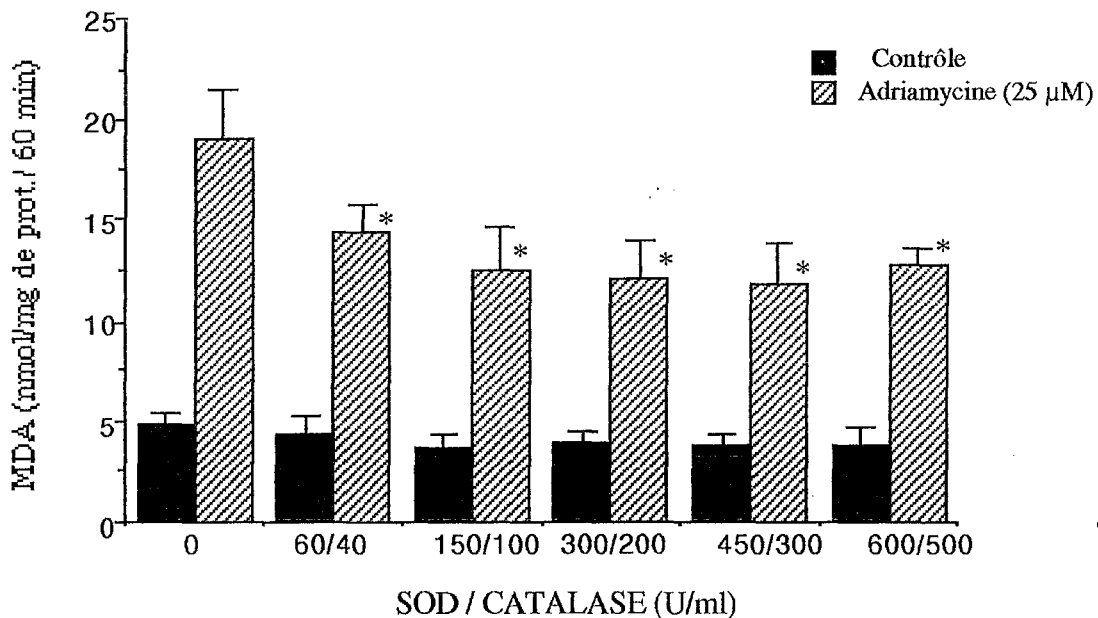


Fig. 19 : Effet de la SOD et de la catalase (ensembles) sur la production de MDA dans les microsomes, en présence et en absence de 250 μM d'adriamycine. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± la déviation standard de 3 expériences .

*p < 0,05 par rapport au témoin sans SOD/catalase (Student t.).

3.4.1.2. Sur la production des HPO

Comme pour les MDA, nous avons testé l'effet de la SOD, de la catalase, puis des deux en même temps, sur la production des HPO dans les microsomes stimulée par l'adriamycine.

Les dosages sont effectués dans les conditions décrites précédemment (microsomes 1mg de protéines/ml, NADPH 2,5 mM), en présence et en absence de 250 μ M d'adriamycine et après une incubation de 15 min à 37°C.

La SOD à des concentrations comprises entre 0 et 300 U/ml n'inhibe pas la production d'HPO. Elle a, au contraire, tendance à stimuler leur production (Fig. 20).

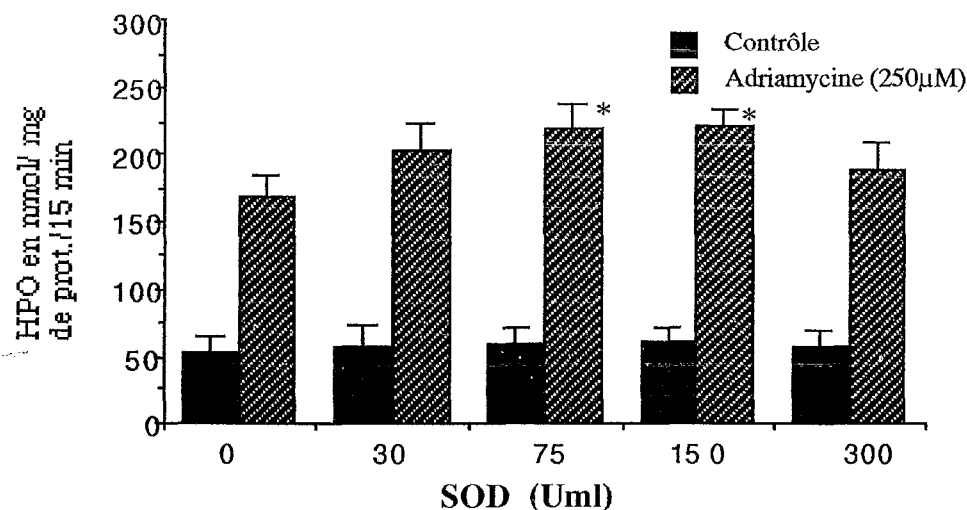


Fig. 20 : Effet de la SOD Effet de la catalase sur la production de HPO dans les microsomes, en présence et en absence de 250 μ M d'adriamycine..Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard de 3 expériences.

* $p < 0,05$ par rapport au témoin sans SOD (Student t.)

La catalase incubée en présence de 250 μ M d'adriamycine n'exerce aucun effet sur la peroxydation induite par l'adriamycine(fig 21), alors que la SOD et la catalase (ensembles) inhibent significativement cette peroxydation (Fig. 22).

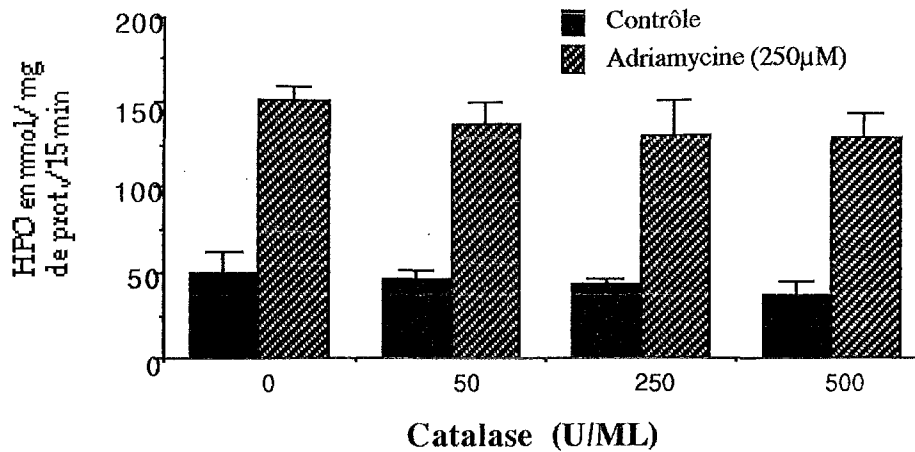


Fig. 21 : Effet de la catalase sur la production de HPO dans les microsomes, en présence et en absence de 250 µM d'adriamycine. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± la déviation standard de 3 expériences.

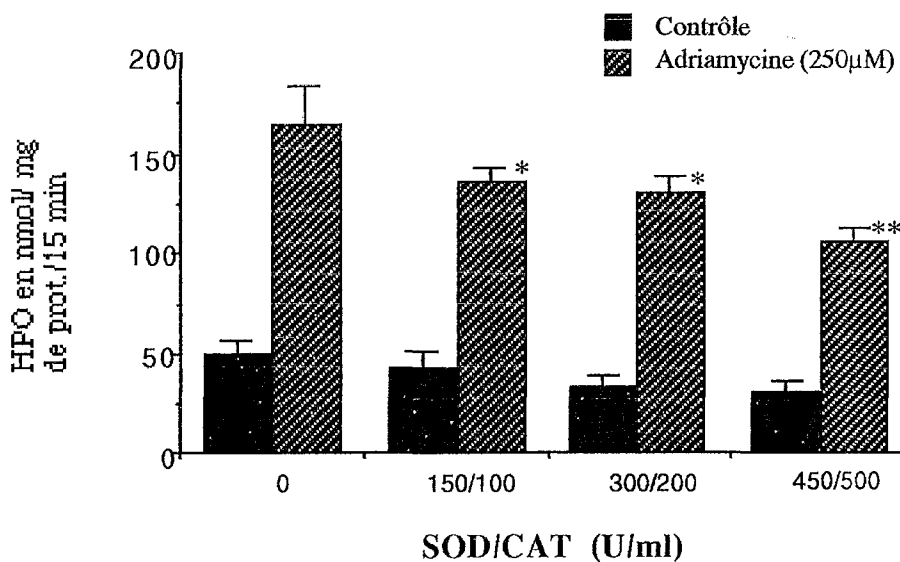


Fig. 22 : Effet de la SOD et Catalase sur la production de MDA dans les microsomes en présence et en absence de 25 µM d'adriamycine. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SD de 3 expériences.

**p<0,01; *p< 0,05 par rapport au témoin sans SOD/catalase (Student t.)

3.4.2. Effet du zinc et du sélénium.

Nous avons testé l'effet du zinc et du sélénium sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine in vitro. Les deux éléments sont préincubés avec les microsomes pendant 90 min avant le déclenchement de la peroxydation par l'adriamycine et le NADPH. Le reste de la manipulation est réalisé dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre "matériels et méthodes". Les concentrations utilisées sont comprises entre 0 et 500 µM de zinc ou de sélénium.

Comme le montre la figure 23, le zinc semble jouer un rôle protecteur important vis-à-vis de la peroxydation induite par l'adriamycine. En effet, on obtient une inhibition progressive puis complète de la production de MDA à partir de 500 μM de zinc.

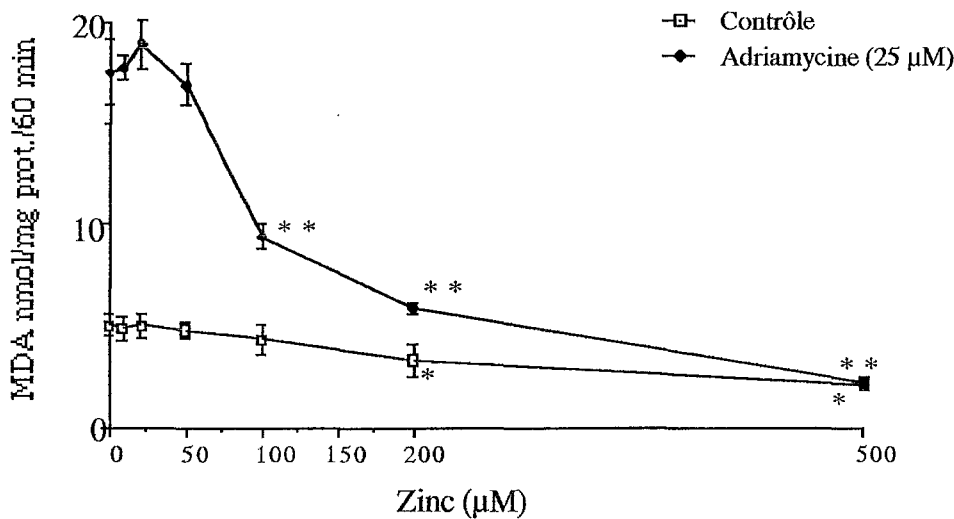


Fig. 23 : Effet du zinc sur la production de MDA dans les microsomes en présence et en absence de 25 μM d'adriamycine. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard de 3 expériences
 ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ par rapport au témoin sans zinc (Student t).

Le sélénium quand à lui, ne produit aucun effet (Fig. 24).

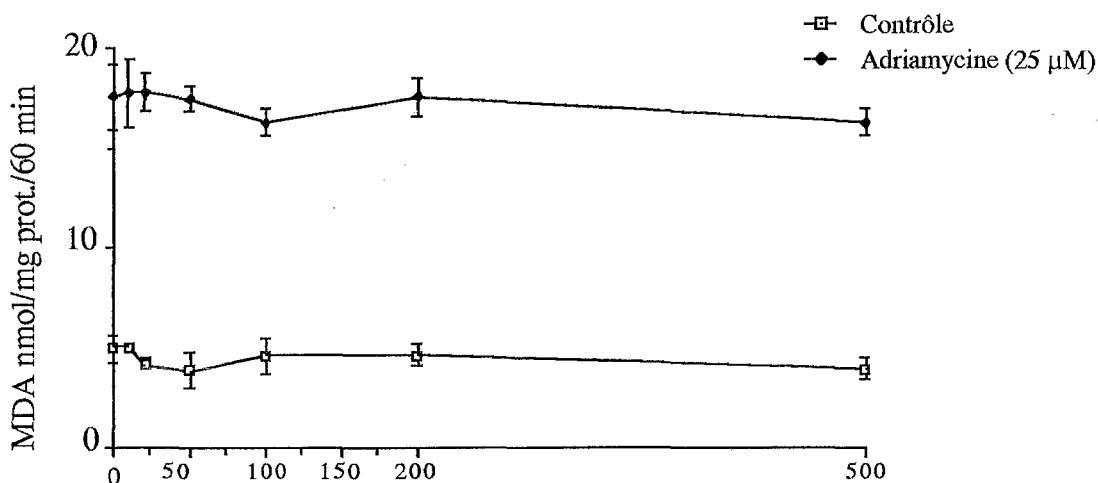


Fig. 24 : Effet du sélénium sur la production de MDA dans les microsomes en présence et en absence de 25 μM d'adriamycine
 Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard de 3 expériences .

3.4.3. Effet de l' α -tocophérol (vitamine E) et du Glutathion

Ces deux substances ont été testées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

le tableau III regroupe les résultats obtenus avec l' α -tocophérol et le glutathion. L' α -tocophérol inhibe de façon nette et complète la peroxydation induite par l'adriamycine, cet effet s'exerce autant sur la peroxydation microsomale endogène que sur celle induite par l'adriamycine, et cela, à partir d'une concentration en α -tocophérol de 20 μ M.

En revanche, le glutathion ne semble exercer aucun effet dans ce système.

MDA (nmol/mg prot./60 min.)		
	Contrôle	+ Adriamycine (25 μ M)
<u>α-tocophérol</u>		
0	5,40 \pm 0,37	19,00 \pm 2,25
20 μ M	2,40 \pm 0,20	3,00 \pm 0,45
40 μ M	2,33 \pm 0,21	2,60 \pm 0,29
100 μ M	2,34 \pm 0,21	2,10 \pm 0,28
250 μ M	2,20 \pm 0,07	2,20 \pm 0,21
<u>Glutathion</u>		
50 μ M	5,65 \pm 1,08	18,27 \pm 0,75
100 μ M	5,70 \pm 0,75	19,10 \pm 0,71
250 μ M	5,30 \pm 0,28	18,50 \pm 0,91

Tab. III : Effet de l' α -tocophérol, et du glutathion sur la production de MDA dans les microsomes en présence et en absence de 25 μ M d'adriamycine. les résultats sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard de 3 à 4 expériences .

3.4.4. Effet du mannitol

Le mannitol est un scavenger spécifique des radicaux hydroxyles. Son effet sur la peroxydation microsomale adriamycine-dépendante a été évalué dans le but d'apprécier le rôle des radicaux $^{\circ}$ OH au cours du phénomène peroxydatif.

Les concentrations testées vont de 0 à 5 mM.

Comme le montre la figure 25, le mannitol inhibe effectivement la peroxydation microsomale adriamycine dépendante. Cette inhibition est progressive et nette à partir d'une concentration de 0,5 mM (>50%)

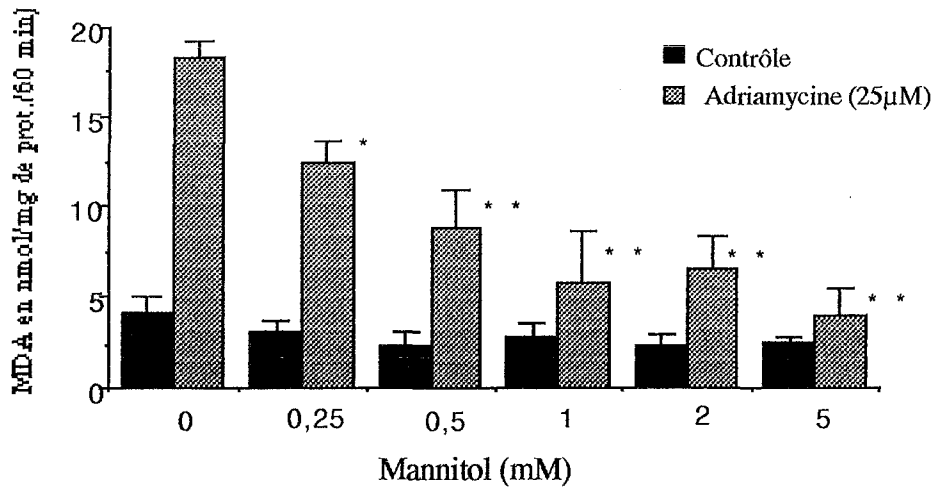


Fig. 25 : Effet du mannitol sur la production de MDA dans les microsomes en présence et en absence de 25 µM d'adriamycine. les résultats sont exprimés par la moyenne ± la déviation standard de 3 à 4 expériences.

**p<0,01 ; *p< 0,05 par rapport au témoin sans mannitol (Student t)..

3.4.5. Effet du Désferal (désferrioxamine).

La désferrioxamine ou Désferal* est un chélateur spécifique du fer ferreux à partir de différentes protéines ferrugineuses de l'organisme (ferritine, hémosidérrine).

La production de MDA, endogène ou après stimulation par l'adriamycine, dans le système microsomale, est complètement inhibée par le Désferal (Tab IV).

<u>Désferrioxamine</u>	<u>Contrôle</u>	<u>Adriamycine (25µM)</u>
0	5,40 ± 0,37	19,00 ± 2,25
2 mM	1,24 ± 0,48	1,51 ± 0,65
5mM	1,60 ± 0,97	1,85 ± 0,02

Tab. IV : Effet de la désferrioxamine sur la production de MDA dans les microsomes en présence et en absence de 25 µM d'adriamycine. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± la déviation standard de 3 expériences .

4. DISCUSSION DES RESULTATS.

Les microsomes hépatiques constituent un modèle de choix pour l'étude *in vitro* de la peroxydation lipidique induite par les drogues redox-cycling.

En effet, tous les éléments nécessaires à l'activation de ces drogues et au déclenchement du phénomène peroxydatif sont présents dans les préparations microsomales⁹⁷ :

- Les enzymes du système cytochrome P-450 (oxydo-réductases) qui catalysent les processus oxydatifs.

- Les acides gras polyinsaturés.

- Les métaux de transition, en particulier le fer (celui-ci étant présent dans nos préparations de microsomes à des concentrations de $28,3 \pm 3,34$ mg/l). Le fer se trouve dans les microsomes essentiellement sous forme de ferritine⁵⁰.

La peroxydation microsomale peut être étudiée de différentes manières :

- mesure de la consommation d'oxygène moléculaire,

- mesure des diènes conjugués,

- mesure de la formation du malondialdéhyde et/ ou des hydroperoxydes organiques.

Nous avons, au cours de ce travail, et pour toutes les expériences réalisées, utilisé le dosage du MDA comme marqueur de la lipoperoxydation microsomale et dans une moindre mesure, le dosage des hydroperoxydes organiques.

Le métabolisme de l'adriamycine par les microsomes hépatiques en présence de NADPH génère le radical semiquinone. Celui-ci peut transférer un électron à l'oxygène moléculaire pour former le radical superoxyde et d'autres radicaux oxygénés⁹⁸.

Une des conséquences majeures de cette production d'ERO est l'attaque des lipides des membranes microsomales.

Comme nous l'avons montré, le degré de peroxydation induite par l'adriamycine dépend de la concentration en protéines microsomales et de la présence, dans le milieu réactionnel, d'une quantité adéquate de NADPH. Les concentrations optimales de

⁹⁷Sevanian A., Nordenbrand K., Kim E., Ernster L., Hochstein P. (1990) Microsomal lipid peroxidation : the role of NADPH-Cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450. *Free Rad. Biol. Med.*, 8, 145-152.

⁹⁸Kappus H. (1986) Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and redox cycling. *Biochem. Pharmacol.*, 35(1), 1-6.

protéines sont comprises entre 0,8 et 1,2 mg de protéines/ ml, et celles du NADPH de 2,5 mM. Ce sont les concentrations que nous avons adoptées dans ce travail.

Nos résultats ont montré que la production de MDA augmente en fonction du temps d'incubation de l'adriamycine avec les microsomes hépatiques. Cette production est maximale après une incubation de 60 min à 37°C en présence de NADPH.

En revanche, la production de MDA n'est pas proportionnelle à la concentration en adriamycine. Le maximum (4 à 5 fois plus que le témoin sans adriamycine) est obtenu pour une concentration d'adriamycine de 25 μ M. Aux fortes concentrations d'adriamycine, le taux de MDA produit ne diffère pas significativement du taux basal produit dans les mêmes conditions, sans adriamycine. Nos résultats sont à ce niveau comparables à ceux retrouvés dans la littérature^{4,2,9}.

Si l'on considère les hydroperoxydes produits dans les microsomes stimulés par différentes concentrations d'adriamycine, la peroxydation est inversement proportionnelle aux temps d'incubations du mélange réactionnel et, est proportionnelle à la concentration en adriamycine. Elle est en effet, maximale immédiatement après le déclenchement du processus et pour des concentrations élevées d'adriamycine (250 μ M).

Cela peut sembler paradoxale lorsque l'on sait que les MDA proviennent en général du catabolisme des hydroperoxydes et que, théoriquement, les deux paramètres sont sensés varier dans le même sens.

Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses :

La première :

Aux faibles concentrations d'adriamycine (25 μ M), un phénomène d'oxydation lipidique par le complexe adriamycine-fer semblerait dominer. Ceci a pour conséquences la cassure des chaînes lipidiques et la libération des produits finaux comme le MDA.

En revanche, aux fortes concentrations d'ADR (250 μ M), un autre phénomène semblerait se produire. La formation considérable d'HPO et le peu de MDA produits laissent suggérer que l'adriamycine, à ces concentrations, subirait effectivement le cycle redox avec pour conséquence la production des anions superoxydes et des radicaux hydroxyles qui aboutissent par de multiples voies à la production d'HPO.

La deuxième qui semble la plus plausible :

⁹Mimnaugh E.G., Trush M., Gram T. (1981) Stimulation by adriamycin of rat heart and liver microsomal NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 30(20), 2797-2804.

Aux faibles concentrations d'adriamycine, la peroxydation des lipides membranaires donne naissance à la formation d'hydroperoxydes qui se dégradent, entre autres, en produits TBA réactants (MDA).

Aux fortes concentrations, le catabolisme des hydroperoxydes formés par l'action de l'adriamycine serait orienté vers d'autres voies cataboliques, donnant naissance à des produits non TBA réactants, (4-hydroxynonéanal, ...).

Enfin, il a été rapporté³⁷, qu'à fortes concentrations, l'adriamycine peut se polymériser et perdre son pouvoir redox-cycling, ce qui peut expliquer la faible production de MDA. Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer la forte production des HPO observée dans notre étude.

Différents auteurs stipulent que la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine est due à la formation de radicaux hydroxyles dans le milieu réactionnel^{40,100}.

Afin d'incriminer les espèces réactives de l'oxygène responsables de cette peroxydation et d'expliquer la divergence des résultats précédents en terme de formation des MDA et des HPO, nous avons voulu étudier par résonance paramagnétique électronique la nature de ces radicaux dans les microsomes stimulés par une faible et une forte concentration d'adriamycine.

Nous avons observé au cours de cette expérience, que la quantité de radicaux °OH produits dans les microsomes, est proportionnelle à la concentration en adriamycine. Par conséquent, l'hypothèse d'une auto-inhibition de l'activité redox-cycling aux fortes concentrations d'adriamycine par une polymérisation de celle-ci est à exclure.

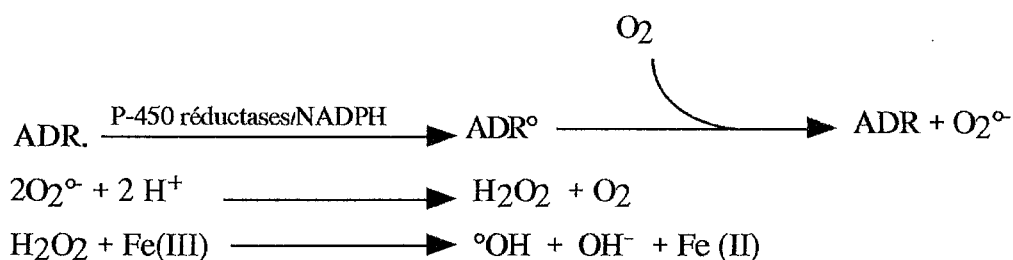
La peroxydation microsomale nécessite des quantités catalytiques de fer. Au cours des expériences que nous avons menées, nous n'avons pas apporté de fer exogène au milieu réactionnel. En effet, le fer nécessaire au déclenchement des réactions radicalaires est présent naturellement dans les préparations microsomales notamment sous forme de ferritine. Il est, en outre, facilement mobilisable de la ferritine par l'adriamycine¹⁰¹.

Nous avons confirmé la nécessité du fer dans le processus peroxydatif en incubant le mélange réactionnel en présence d'un chélateur spécifique du fer : la désferrioxamine. Celle-ci inhibe, effectivement, totalement la peroxydation induite par l'adriamycine.

¹⁰⁰Turner M.J., Everman D.B., Ellington S.P., Fields C. (1990) Detection of free radicals during the cellular metabolism of adriamycin. *Free Rad. Biol. Med.*, 9, 415-421.

¹⁰¹Minotti G. (1989) Adriamycin-dependent release of iron from microsomal membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 286, 398-403.

Le fer est nécessaire à l'initiation de la réaction de FENTON et à la production de radicaux $^{\circ}\text{OH}$ à partir du peroxyde d'hydrogène :



En outre, le complexe adriamycine-fer peut être directement impliqué dans la propagation des processus peroxydatifs¹⁰².

Mimnaught et coll.⁹⁹ rapportent que la superoxyde dismutase inhibe la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine. Minotti¹⁰³ a également observé une inhibition par la SOD de la peroxydation induite par l'adriamycine. Le même auteur a rapporté une stimulation de cette peroxydation par la catalase ou par la combinaison de la SOD et de la catalase. Il a conclu que l'inhibition de la peroxydation par la SOD serait due à la formation de peroxyde d'hydrogène qui a pour conséquence d'oxyder le Fe(II), alors que la stimulation par la catalase s'expliquerait par la dégradation de ce peroxyde d'hydrogène formé et le maintien du fer à l'état ferreux, nécessaire à l'initiation de peroxydation lipidique par l'adriamycine.

Au cours de ce travail, nous avons observé une inhibition modérée par la SOD de la peroxydation induite par l'adriamycine et évaluée par le taux de MDA. Cette même enzyme n'exerce pas d'effet inhibiteur sur la peroxydation microsomale aux fortes concentrations d'adriamycine. Celle-ci tend, au contraire, à stimuler la production des hydroperoxydes. Par ailleurs, la catalase n'exerce aucun effet dans les deux concentrations d'adriamycine testées. Alors que la combinaison de la SOD et de la catalase, contrairement aux observations de Minotti, inhibent partiellement la peroxydation microsomale dans notre étude.

L'inhibition modérée de la peroxydation observée en présence de ces enzymes, nous laisse penser que d'autres mécanismes, en dehors du mécanisme classique de production du radical hydroxyle par la réaction de FENTON, interviennent dans la peroxydation

¹⁰²Miura T., Muraoka S., Ogiso T. (1991) Lipid peroxidation of rat erythrocyte membrane induced by adriamycine-Fe³⁺. *Pharmacol. Toxicol.*, 69, 296-300.

¹⁰³Minotti G. (1990) NADPH and adriamycin-dependent microsomal release of iron and lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 277(2), 268-276.

induite par l'adriamycine. Il s'agit probablement comme l'a décrit Winterbourn⁵⁰, d'une action directe du radical semiquinone sur les hydroperoxydes organiques préexistants dans les microsomes hépatiques. Ce radical, pourrait en effet, arracher directement un atome d'hydrogène aux hydroperoxydes et entraîner la propagation du processus peroxydatif.

Nous avons également testé un certain nombre d'antioxydants non enzymatiques.

Dans ce travail, le zinc inhibe nettement la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine. Cette inhibition est probablement due à une interaction avec le cytochrome p-450. En effet, Jeffery¹⁰⁴ a rapporté que le zinc inhiberait fortement cette enzyme.

Le zinc inhiberait donc la réduction de l'adriamycine par l'altération du potentiel oxydo-réducteur des flavoprotéines et par l'interaction avec le complexe flavoprotéines/cytochrome P-450.

Enfin, l'effet inhibiteur du zinc sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine pourrait également être dû à la stabilisation des membranes lipidiques, ainsi qu'au déplacement du fer du complexe adriamycine-fer pour former un complexe adriamycine-zinc redox inactif³⁷.

L'effet antioxydant du zinc a déjà été rapporté dans d'autres conditions de stress oxydatif. En ce sens, le zinc inhibe la peroxydation induite par le CCl₄ chez l'animal ainsi que dans des préparations de microsomes hépatiques isolés¹⁰⁵. En outre, la peroxydation microsomale induite par l'alcool est plus importante chez les rats déficients en zinc¹⁰⁶. Le zinc inhibe également la production de MDA induite par le système fer-xanthine oxydase-xanthine dans les membranes érythrocytaires.

S'agissant du sélénium, l'incubation préalable des microsomes avec le sélénium ne modifie pas la production des MDA induite par l'adriamycine. En revanche, le sélénium exerce un effet inhibiteur net dans les modèles *in vivo*⁵¹.

Son action est, en effet, liée à l'induction de l'activité glutathion peroxydase qui ne peut pas s'exercer dans des systèmes isolés.

Nous avons, au cours de ce travail, testé d'autres scavengers des radicaux oxygénés.

¹⁰⁴ Jeffery E.H. (1983) The effect of zinc on NADPH oxidation and monooxygenase activity in rat hepatic microsomes. *Mol. Pharmacol.*, 23, 467-473.

¹⁰⁵ Chvapil M., Ryan J.N., Elias S.L., Peng Y.M. (1973) Protective effect of zinc on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Exp. Mol. Pharmacol.*, 19, 186-196.

¹⁰⁶ Sullivan J.F., Jetton M.M., Hahn H.K.J. (1980) Enhanced lipid peroxidation in liver microsomes of zinc-deficient rats. *Am. J. Clin. Pathol.*, 33, 51-56.

A la concentration minimale testée (20 μM), la vitamine E inhibe totalement la peroxydation microsomale endogène ou stimulée par l'adriamycine. Elle inhibe la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux hydroperoxy⁵², empêchant ainsi, la propagation du processus peroxydatif.

Le mannitol, scavenger des radicaux $^{\circ}\text{OH}$, s'est avéré également un inhibiteur puissant de la peroxydation induite par l'adriamycine. A la concentration d'une mmol/l de mannitol, le pourcentage d'inhibition est de plus de 70%. Ces résultats confirment l'importance capitale des radicaux hydroxyles dans la peroxydation induite par l'adriamycine.

En conclusion, nos résultats confirment la formation des espèces radicalaires oxygénées par l'adriamycine. Ils démontrent également la complexité des réactions mises en jeu. La majorité des antioxydants testés dans ce travail s'est avérée efficace pour freiner le processus peroxydatif déclenché par l'adriamycine dans les microsomes hépatiques de rats. Ceci confirme l'implication de différents radicaux oxygénés dans ce processus. Il en résulte que la toxicité des anticancéreux, susceptibles de générer des radicaux libres, peut être diminuée, à défaut d'être effacée, par des antioxydants adéquats.

Cependant, la participation éventuelle de cette production radicalaire à l'activité antitumorale des drogues concernées fait l'objet actuellement d'un grand débat¹⁰⁷. Il n'est pas à exclure que les radicaux libres ainsi produits soient nécessaires à l'action antitumorale. Il n'en demeure pas moins que les cellules saines soient prises pour cibles par ces radicaux libres.

En ce sens, des études complémentaires sont encore nécessaires afin d'évaluer l'effet des antioxydants sur la toxicité de l'adriamycine chez l'animal, mais également sur l'activité biologique antitumorale, avant de pouvoir tirer des conclusions définitives dans ce domaine.

¹⁰⁷Butler J., Hoey B.M. (1987) Are reduced quinones necessarily involved in the antitumor activity of quinone drugs. Br. J. Cancer, 55, 53-59.

CONCLUSION

L'importance des formes réactives de l'oxygène et le stress oxydatif engendré par les anticancéreux ont été largement étudiés. Nous avons choisi, au cours de ce travail d'apporter, notre contribution, en nous intéressant aux mécanismes de peroxydation microsomale induite par l'adriamycine.

Nos travaux ont porté tout d'abord sur l'évaluation de la production de radicaux oxygénés par l'adriamycine dans les microsomes hépatiques, et la quantification du processus peroxydatif qui en découle, puis, nous avons testé l'effet de certains antioxydants sur ces phénomènes.

L'extension de ce travail à d'autres molécules anticancéreuses, que nous avons d'ailleurs engagé, semble nécessaire, pour corrélérer les phénomènes peroxydatifs observés in vitro avec les toxicités décrites in vivo.

Au-delà de cette perspective, notre travail sur l'adriamycine in vitro devrait être poursuivi, car les questions auxquelles il faudra répondre demeurent nombreuses :

- Les phénomènes observés in vitro peuvent-ils expliquer l'activité de l'adriamycine in vivo? Autrement dit, la cytotoxicité et la toxicité (particulièrement cardiaque) seraient-elles imputées aux phénomènes peroxydatifs?

- Les cellules cancéreuses soumises à l'action de l'adriamycine génèrent-elles plus ou moins de radicaux oxygénés par rapport aux cellules saines?

- Les cellules cancéreuses comportent-elles des systèmes de défense antiradicalaire similaires à ceux des cellules saines.

Des travaux sur d'autres modèles, in vitro mais aussi in vivo, permettront peut être, de répondre à ces questions.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Devita V.T. Principe du traitement du cancer. In : Harrisson T.R. Principes de médecine interne, Flammarion Médecine-Sciences éd., 1988, p. 1709-1725.
2. Crauste-Manciet S., Faure P., Madelaine I., Saulnier J.L. Anticancéreux : utilisation pratique. Dossier du CNIMH, hors série, 1992.
3. Poullart P. (1991) Médicaments cytostatiques-cytolytiques. Pharmacologie et thérapeutique. La lettre du pharmacologue, 9(5), 314-330.
4. Calop J., Carraz G. Anticancéreux et cancérogènes. In : Calop J., Carraz G. Pharmacodynamie spéciale, tome 4, Ellipses éd., 1988, p. 181-229.
5. Marty M., Calvo F., Espie M., Lagier J.M., Florentin I., Giroud J.P. Médicaments anticancéreux. In : Giroud J.P., Mathé G., Meyniel G. Pharmacologie clinique : bases thérapeutiques. Expansion Scientifique Française, 2 éd., 1988, p. 1894-1945.
6. Espie M., Extra J.M., Marty M. Pharmacologie anticancéreuse. In : Schorderet M. Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Frison-Roche 2 éd, 1992, p. 795-819.
7. Clavel M. (1991) Chimiothérapies anticancéreuses, classification et mode d'action. Rev. Prat., 41(26), 2759-2766.
8. Piettre D. (1990) Classification clinique des anticancéreux à partir de leurs effets indésirables. La Pharmacie hospitalière française, 94, 1379-1396.
9. Rose W.C., Scuring J.E. (1985) Preclinical antitumor and toxicologic profil of carboplatin. Cancer Treat. Rev., 12 (suppl A), 1-20.
10. Fraasier L.H., Kanekal S., Kehrerj.P. (1991) Cyclophosphamide toxicity, charaterising and avoiding the problem. Drugs, 42 (5), 781-795.
11. Mugia F.M., Louie A.C., Sikic b.I. (1983) Pulmonary toxicity of antitumor agents. Cancer Treat. Rev., 10, 221-243.
12. Lacroix J., Jousselin T., Lacroix R. (1988) Vers une chimiothérapie plus efficace et mieux tolérée. Pharm. Hosp., 94, 35-41.
13. Aymard J.P., Ferry R., Netter P. Ballaud A., Streif F. (1985) Toxicité cardiaque des alcaloïdes de la pervenche, étude critique de la littérature. Thérapie, 40, 361-364.
14. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases : an overview. In : Methods in Enzymology, Vol 186. Academic Press, New York, 1990, p. 1-85.
15. Emerit J., Fechner J., Galli A. , Clavel J.P. , Congy F. (1986) Les radicaux libres dérivés de l'oxygène et la peroxydation lipidique. Rôle en biologie et en physiopathologie. Presse méd., 15 (16), 751-754 .
16. Clark J.M. (1974) The toxicity of oxygen. Am. Rev. Resp. Dis., 110, 40-50 .
17. Enrique C. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. Annu. Rev. Biochem., 58, 79-10.

18. Koukay N. Rôle du zinc et du sélénium dans la génération des radicaux libres lors des accidents ischémiques du myocarde. Thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier. Grenoble I, 1989.
19. Fridovich I. (1978) The biology of oxygen radical. *Science*, 201, 875-880.
20. Gabit G.T., Barior B.M. (1979) The oxygen forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 254, 9070-9074.
21. Hearse D.J., Manning A.S., Downey T.M., Yellon D.M. (1986) Xanthine oxidase : A critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Acta. Physio. Scand.*, 548 (suppl.), 75-78.
22. Favier A. Interêt des marqueurs de la peroxydation lipidique. Comptes rendus des XIIIèmes journées nationales de biologie. Lyon, le 26-27 Janv. 1990, 45-53.
23. Slater T.F. (1984) Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.*, 222, 1-15.
24. Kasai H., Nishimura S. (1986) Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical forming agents. *Environ. Health. Perspect.*, 67, 111-117
25. Gutteridge J.M.C., Halliwell B. (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, 15 (4), 129-135.
26. Chiu D., Kuypers F., Lubin B. (1989) Lipid peroxidation in human red cells. *Seminars in hematology*. 26(4), 257-276 .
27. Dillard C., Tappel L. (1989) Lipid peroxidation products in biological tissues. *Free Rad. Biol. Med.*, 7, 193-196.
28. Chance B., Sies H., Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Reviews*, 59(3), 527-604.
29. Deby C., Pencemail J. (1986) Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et moyens de défense. *Presse Méd.*, 31, 1468-1473.
30. Ursini F. Mairorino M., Gregolin C. (1985) The selenoenzyme phospholipide hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem. Bioph. Acta.*, 839, 62-70.
31. Serbinov A.E., Kafan V., Hand D., Packer L. (1991) Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Rad. Biol. Med.*, 10, 263-275.
32. Kenneth S.G., Channa R., Richard W. (1989) Reduced glutathione effects on alpha-tocopherol concentrations of rat liver microsomes undergoing NADPH-dependent lipid peroxidation. *Lipids*, 24(11), 909-914.
33. Halliwell B. Gutteridge J.M.C. (1985) Oxygen radicals and the nervous system. *Trends. Neurosci.*, 8, 22-26.
34. Burton G.W. Ingold K.V. (1984) Beta-caroten : an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569-573.
35. Machlin L.J., Bendich A. (1987) Free radical tissues damage : protective role of antioxidants nutrients. *FASEB J.*, 1, 441-445.

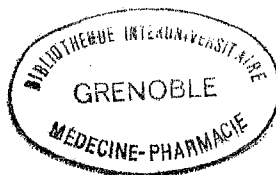
36. Kappus H., Sies H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism : Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37(12), 1233-1358.
37. Powis G. (1989) Free radical formation by antitumor quinones. *Free Rad. Biol. Med.*, 6, 63-101.
38. Sato S., Iwaizumi M., Handa K., Tamura Y. (1977) Electron spin resonance study on the mode of generation of free radicals of daunomycin, adriamycin and carboquone in NADPH microsomal system. *Gann.*, 68, 603-608.
39. Cummings J. (1991) The molecular pharmacology of Doxorubicin in vivo. *Eur. J. Cancer*, 27(5) 532-535.
40. Kalyanaraman B. Morehouse K.M. Masson R. P. (1991) An electron paramagnetic resonance study of the interaction between the adriamycin semiquinone, hydrogen peroxide, iron-chelators, and radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 283(1), 164-170.
41. Kalyanaraman B., Sealy R.C., Sinha B.K. (1984) An electron spin resonance study of the reduction of peroxydes by anthracyclines semiquinones. *Biochem. Biophys. Acta.*, 799, 270-275.
42. Minotti G., Di Gennaro M., D'ugo D., Granone P. (1991) Possible source of iron for lipid peroxidation. *Free Rad. Res. Comms.*, 12-13, 99-106.
43. Hasinof B. (1989) Self reduction of the iron(III)-doxorubicin complex. *Free Rad. Biol. Med.*, 7, 583-593.
44. Takahashi Naohiro Schreiber J., Fischer V. Mason R. (1987) Formation of glutathione-conjugated semiquinones by the reaction of quinones with Glutathione : An ESR study. *Arch. Biochem. Biophys.*, 252(1), 41-48.
45. Hassinof B.D., Davey J.P., O'Brien P.J. (1989) The Adriamycin (doxorubicin)-induced inactivation of cytochrome oxydase on the presence of iron and coper. *Xenobiotica*, 19(2), 231-241.
46. Berg H., Horn G., Luthardt V. (1981) Interaction of anthracycline antibiotics with biopolymers, polarographic behavior and complexes with DNA. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 8, 537-558.
47. Mundi J.R.F., Sinha B.K., Gianni L., Meyers C.E. (1984) Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracyclines-iron complex. *FEBS Lett.*, 172, 226-230.
48. Doroshow L.H., Akman S., Esworthy S., Chu F.F., Durbe T. (1991) Doxorubicin resistance conferred by selective enhancement of intracellular glutathione peroxydase of superoxide dismutase content in human MCF-7 breast cancer cells. *Free Rad. Res. Comms.*, 12-13, 1-10.
49. Pritsot C. A. Sokoloff M., Gustafson D.L. (1992) PZ-51 (Ebselen) in vivo protection against Adriamycin-induced mouse cardiac and hepatic lipid peroxidation and toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 44(4), 839-841.
50. Winterbourn C.C., Vile G.F., Monteiro H.P. (1991) Ferritin, lipid peroxidation and redox-cycling xenobiotics. *Free Rad. Res. Comms.*, 12-13, 107-114.

51. Coudray C., Mouhiedine S., Richard M.J., Arnaud J., De Leiris J., Favier A. (1992) Effect of adriamycin on chronic cardiotoxicity in selenium deficient rats. *Basic Res. Cardiol.*, 87, 173-183.
52. Glenn F.V., Winterbourn C.C. (1988) Inhibition of adriamycin-promoted microsomal lipid peroxidation by β -caroten α -tocopherol and retinol at high and low oxygen partial pressures. *FEBS Lett.*, 238(2), 353-356.
53. Sangeetha P., Das U.N., Koratkar R., Suriaprabha P. (1990) Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Rad. Biol. Med.*, 8, 15-19.
54. Faber M., Hida H., Coudray C., Mousseau M., Favier A., (1993) Lipid peroxidation products and trace elements statuts in patients with cancer before and after chemotherapy including Adriamycin. *Biol.Trace Elem. Res.*, Sous presse.
55. Benchekroun M.N., Sinha B.K., Robert J. (1993) Doxorubicin induced oxygen free radical formation in sensitive and doxorubicin-resistant variants of rat glioblastoma cell lines. *FEBS*, 322(3), 295-298.
56. Sinha B.K., Mimnaugh E.G. (1990) Free radicals and anticancer drug resistance : oxygen free radicals in the mechanism of drug cytotoxicity and resistance by certains tumors. *Free Rad. Biol. Med.*, 8, 567-581.
57. Dorochow J.H., Davis K.J.A. (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 261(7), 3068-3074.
58. Lown W.Chen H. Plambeck J.A. (1982) Further studies on the generation of reactivess oxygen species from activated anthracyclines and the relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects. *Biochem. Pharmacol.*, 31(4) 575-581
59. Vile G., Winterbourn C. (1990) Thiol oxidation and inhibition of Ca-ATPase by Adriamycin in rabbit heart microsomes.
60. Meyers C.; Mc Guire W., Young R., (1978) Adriamycin : Ameliorationn of toxicity by a-tocopherol. *Cancer treat. Rep.*, 60(7), 961-962.
61. Tewey K.M., Rowe T.C., Halligan B.D., Lui L.F. (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mamalian DNA Topoisomerase II. *Science.*, 226, 466-468
62. Fisher G.R., Patterson L.H. (1991) DNA strand breakage by peroxidase-activated mitoxantrone. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 65-68.
63. Patterson L.H., Gandecha B.M., Brown J.R. (1983) 1,4 bis(2-{(2-hydroxyethyl) amino}-9,10-anthracendione, an anthraquinone antitumor agent that does not cause lipid peroxidation in vivo, comparison with daunorubicin. *Biochem. Biophy. Res. Comm.*, 2(110), 399-405.
64. Sasville E.A., Peisach J. Horwitzs B. (1978) Effect of chelating agent and metal ions on the degradation of DNA by Bleomycine. *Biochemistry*, 17, 2740-2754.
65. Scheulen M.E. Kappus H. Thyssen D., Schmidt C.G. (1981) Redox cycling of Fer(III)-Bleomycin by NADPH-Cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Pharmacol.*, 24(30), 3385-3381.

66. Favaudon V. (1982) On the mechanism of reductive activation in the mode of action of some anticancer drugs. *Biochimie*, 64, 457-475.
67. Smith P.J. (1987) Ferrous iron-mediated enhancement of DNA damage and recovery potential in Bleomycin treated human cells. *Biochem. Pharmacol.*, 4(36), 475-480.
68. Tom W.M., Montgomery M.R. (1980) Bleomycin toxicity : alterations in oxidative metabolism in lung and liver microsomal fractions. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 3239-3244.
69. Ledwozym L. (1991) Protective effect of liposomes-entrapped superoxide dismutase and catalase on bleomycin-induced lung injury in rats. *Acta Vet. Hung.*, 39, 215-224.
70. Sartoelli A.C. (1986) The role of mitomycin antibiotics in the chemotherapy of solid tumors. *Biochem. Pharmacol.*, 1(35), 67-69
71. Bachur R.N., Gordon S.L., Gee M.V. (1978) A general mechanism for microsomal activation of quinones anticancer agents to free radicals. *Cancer Res.*, 38, 1745-1750
72. Graham M.A., Riley R.J., Kerr D.J. (1991) Drug metabolism in carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.*, 51, 275-289.
73. Gutteridge J.M.C., Quinlan G.J., Wilkins S. (1984) Mitomycin C induced deoxyribose degradation inhibited by superoxide dismutase. *FEBS*, 1(167), 37-41
74. Seigel D., Gibson N.W., Ross D. (1990) Metabolism of mitomycin C by DT-diaphorase, role in mitomycin induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, 50, 7483-7489.
75. Dulhanty A.M., Whitmore G.F. (1991) Chinese hamster ovary cell lines resistant to mitomycin C under aerobic but not hypoxic conditions are deficient in DT-diaphorase. *Cancer Res.*, 51, 1860-1865.
76. Bligh H.F., Bartoszek A., Robson C.N., Hickson I.D. (1990) Activation of mitomycin C by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Cancer Res.*, 50, 7789-7792.
77. Artega C.L., Kisner D.L., Goodman A., Von Hoff D.D. (1987) Elliptinium, a DNA agent with broad antitumor activity in a human tumor cloning system. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23, 1621-25.
78. Auclair C., Hyland K., Paoletti C. (1983) Autoxidation of the antitumor drug 9-hydroxyellipticine and its derivatives. *J. Med. Chem.*, 26, 1438-1444.
79. Monsarrat B., Maftouh M., Meunier G. (1987) oxidative biotransformation of the antitumor agent elliptinium acetate. Structural characterization of its human and rat urinary metabolite. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 5, 341-345.
80. Maftouh M., Amiar Y., Picard F.C. (1985) Metabolism of the antitumor drug N2-methyl-9-hydroxyellipticine acetate in isolated rat kidney cells. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 427.
81. Dadoun C., Viotte G.R. (1990) Celliptium induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rat renal cortex. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 27, 178-186
82. Thomas N., Viotte G.R., Rothender M.D., Eserbauer H., Fillastre J.P. (1991) Time course study of lipid peroxidation induced by N2-methyl-9-hydroxyellipticine acetate or Celliptium in rat renal cortex. *Pharmacol. Toxicol.*, 69, 112-116.

83. McGinness J.E., Proctor P.H., Demopoulos G.A. (1978) Amelioration of cis platinum induced nephrotoxicity by orgotein (Superoxide dismutase). *Physiol.Chem. Phys.*, 10, 267-272.
84. Hannemann J., Baumann K. (1988) Cisplatin-induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney : Different effects of antioxidants and radical scavengers. *Toxicology*, 51, 119-132.
85. Sodhi A., Gupta P. (1986) Increased release of hydrogen peroxide and superoxide anion by murine macrophage in vitro after cisplatin treatment. *Int. J. Immunopharmacol.*, 8, 709.
86. Bompert G. (1989) Cisplatin-induced changes in cytochrome P-450, lipid peroxidation and drug-metabolizing enzymes activities in rat kidney cortex. *Toxicology Letters*, 48, 193-199.
87. Bompert G. (1990) Cisplatin-induced changes on cytochromes P-450, lipid peroxidation and some P-450 related specific catalytic activities in rat liver. *J. toxicol. clin. exp.*, 10(6), 375-383.
88. Poupon J. Cisplatinium and free radicals. *Comptes rendus du 4th International Congress on Trace Elements in Medicine and Biology. Trace elements and free radicals in oxydative diseases, Chamonix: April 5th-9th, 1993.*
89. Mans D.R.A., Lafleur M.V.M., Westmijze E.J., VanMaanen J.M.S. (1991) Formation of different reaction products with single and double stranded DNA by the ortho-quinones and the semiquinones free radical of etoposide (VP-16-223) *Biochem. Pharmacol.*, 11(42), 2131-2139.
90. Haim N., Nemeč J., Roman J., Sinha B.K. (1987) In vitro metabolism of etoposide by liver microsomes and irreversible binding of reactive intermediates to microsomal proteins. *Biochem. Pharmacol.*, 4(36), 527-537.
91. Powis G., Hodnett E.M., Santone K.S., Lee See K., Medler D.C. (1987) The role of metabolism and redox cycling in the cytotoxicity of antitumor quinones, quinoneimines, and quinondiimines. *Cancer Res.*, 47, 2363-2370.
92. Murray R.K., *Biomolécules et méthodes biochimiques.* In : Granner D.K., Mayer P.A., murray R.K., Rodwell V.W. *Précis de biochimie.* les presses de l'Université Laval, 7 éd, 1992, p. 4-12.
93. Richard M.J., Guiraud P., Meo J., Favier A. (1992) High performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials using a commercially available reagent. *J. Chromatogr.*, 577, 9-18.
94. Heath R., Tappel A. (1976) A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal. Biochem.*, 76, 184-191.
95. Hida H. *DEA de génie biologique et médical. Mise au point d'une méthode de dosage des hydroperoxydes organiques plasmatique.* Université Claude Bernard. Lyon, 1991.
96. Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951). *J. Biol. Chem.*, 193, 265.

97. Sevanian A., Nordenbrand K., Kim E., Ernster L., Hochstein P. (1990) Microsomal lipid peroxidation : the role of NADPH-Cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450. *Free Rad. biol. Med.*, 8, 145-152.
98. Kappus H. (1986) Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and redox cycling. *Biochem. Pharmacol.*, 35(1), 1-6.
99. Mimnaugh E.G., Trush M., Gram T. (1981) Stimulation by adriamycin of rat heart and liver microsomal NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 30(20), 2797-2804.
100. Turner M.J., Everman D.B., Ellington S.P., Fields C. (1990) Detection of free radicals during the cellular metabolism of adriamycin. *Free Rad. biol. Med.*, 9, 415-421.
101. Minotti G. (1989) Adriamycin-dependent release of iron from microsomal membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 286, 398-403.
102. Miura T., Muraoka S., Ogiso T. (1991) Lipid peroxidation of rat erythrocyte membrane induced by adriamycin-Fe³⁺. *Pharmacol. Toxicol.*, 69, 296-300.
103. Minotti G. (1990) NADPH and adriamycin-dependent microsomal release of iron and lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 277(2), 268-276.
104. Jeffery E.H. (1983) The effect of zinc on NADPH oxidation and monooxygenase activity in rat hepatic microsomes. *Mol. Pharmacol.*, 23, 467-473.
105. Chvapil M., Ryan J.N., Elias S.L., Peng Y.M. (1973) Protective effect of zinc on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Exp. Mol. Pharmacol.*, 19, 186-196.
106. Sullivan J.F., Jetton M.M., Hahn H.K.J. (1980) Enhanced lipid peroxidation in liver microsomes of zinc-deficient rats. *Am. J. Clin. Pathol.*, 33, 51-56.
107. Butler J., Hoey B.M. (1987) Are reduced quinones necessarily involved in the antitumor activity of quinone drugs?. *Br. J. Cancer*, 55, 53-59.



FACULTE DE PHARMACIE

Date : 13/10/93
Heure : 16 h
Lieu : la Troisième

SOUTENANCE DE MEMOIRE
D. E. S. de

NOM et Prénom du Candidat : HIDA Hassan

N° étudiant : 8410366

ADRESSE 12 Av. de la Paix

38320 EYBENS

Téléphone : 76 25 76 78

TITRE DU MEMOIRE

JURY

PRESIDENT : Professeur FAVIER

Membres : Professeur CALO

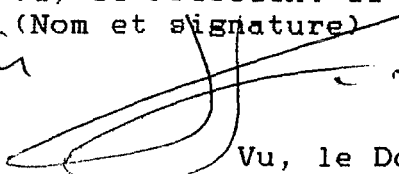
Professeur LACHER

Dr. GOURAY

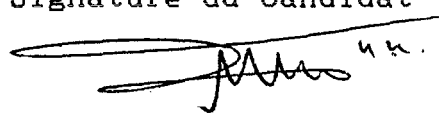
Dr. Debeauvais

Vu, le Président du Jury
(Nom et signature)

Favier



Signature du Candidat



Vu, le Doyen de l'U.F.R. de Pharmacie



J. ROCHAT

Vu, le Président de l'Université J. FOURIER



A. NEMOZ

NOM Prénom

IIIDA Hassan

TITRE DU MEMOIRE

Anticancéreux et espèces réactives de l'oxygène.
Etude de l'effet des antioxydants sur la peroxydation
microsomale induite par l'Adriamycine.

NATURE DU MEMOIRE

Mémoire D.E.S. de "Pharmacie Hospitalière et
des Collectivités" tenant lieu de thèse de Docteur en
Pharmacie. Grenoble 1993.

RESUME

L'importance des formes réactives de l'oxygène et le stress oxydatif engendré par les anticancéreux ont été largement étudiés. Nous avons choisi, au cours de ce travail, d'apporter notre contribution en nous intéressant aux mécanismes de peroxydation microsomale induite par l'adriamycine.

Nos travaux ont porté tout d'abord sur l'évaluation de la production de radicaux oxygénés par l'adriamycine dans les microsomes hépatiques, et la quantification du processus peroxydatif qui en découle. Ensuite, nous avons testé l'effet de certains antioxydants sur ces phénomènes.

La majorité des antioxydants testés dans ce travail s'est avérée efficace pour freiner le processus peroxydatif déclenché par l'adriamycine dans les microsomes hépatiques de rat. Ceci confirme l'implication de différents radicaux oxygénés dans ce processus et laisse libre court à toute initiative visant à réduire la toxicité de l'adriamycine par les antioxydants.

MOTS CLES

Anticancéreux - Radicaux libres - Adriamycine -
Microsomes hépatiques - Peroxydation lipidique -
Antioxydants.

JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur A. FAVIER

MEMBRES

Monsieur le Professeur J. CALOP
Monsieur le Professeur F. LOCHER
Monsieur le Docteur C. COUDRAY
Madame le Docteur I. de BEAUCHAMP

DATE DE LA SOUTENANCE

13 Octobre 1993