



République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université de Jijel
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme
De Docteur Es Sciences en Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option : Toxicologie

THEME

Etude des mécanismes moléculaires de la toxicité cardiaque de la doxorubicine

Présentée le 25 janvier 2010 par

Mohamed ALYANE

Devant le Jury composé de :

Président : Dr. LEGHOUCHI Essaid (Pr., Université de Jijel)
Rapporteur : Dr. LAHOUEL Mesbah (MC, Université de Jijel)
Co rapporteur: Dr. BARRATT Gillian (Pr., Université de Paris sud, France)
Examineur : Dr. FILALI Taha (Pr., Université de Constantine)
Examineur : Dr. DJEBAR Mohamed Reda (Pr., Université de Annaba)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mon directeur de thèse **Dr. LAHOUEL Mesbah**, qui a dirigé l'ensemble de ce travail avec enthousiasme et énergie. Merci de m'avoir fait confiance et encouragé tout au long de mes années de thèse. La qualité de son encadrement tant sur le plan scientifique qu'humain, sa rigueur et son engouement pour la recherche m'ont conduit à tirer le meilleur de moi-même.

J'adresse mes remerciements à madame le **Dr. BARRAT Gillian**, directeur de recherche au sein de l'UMR 8612 et professeur à la faculté de pharmacie université Paris11 d'avoir accepté de diriger ce travail en m'intégrant à son équipe, pour ses conseils et pour les conditions techniques mises à ma disposition afin de réaliser ce travail.

Je remercie le **Dr. FILALI Taher**, professeur au CHU de Constantine et le **Dr. DJEBAR Mohamed Reda**, professeur à l'université de Annaba de m'avoir fait l'honneur d'apporter leur jugement expert sur ce travail. Enfin, je suis particulièrement ravie que Mr le professeur **LEGHOUCHI Essaid** ait accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Melle **Ludivine Houel-Renault** (Centre Commun de Microscopie Electronique, UMR 8080, CNRS/université Paris XI à Orsay) pour son aide pour l'observation des échantillons de liposomes au microscope.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Olivier Seksek** (équipe Génopole à Evry) pour son aide en microscopie de fluorescence et en cytométrie de flux.

Je remercie très amicalement mes collègues de labo en France Gyselle HOLLANDA, Hanh PHAM, Mohamed KHODER, Mohamed OTHMAN et Tamim CHALATI. Je garderai un très bon souvenir de leur aide.

J'ai une pensée particulière pour mon ami de toujours, Abdelkarim, je te remercie vraiment pour tes encouragements et ton écoute de tous les instants.

Je remercie toute ma famille pour son soutien.....Mille Merci.

Mes pensées les plus chères reviendront à mes parents qui m'ont soutenue pendant toutes ces années, chacun à leur manière, et sans qui je n'aurais pas pu aller au bout de mes projets. Je vous aime.

Sommaire

Remerciements	
Sommaire	i
Liste des figures	vi
Introduction Générale	1

Chapitre 1. Les Anthracyclines

1. Historique.....	3
2. Structure des anthracyclines.....	3
3. Mécanismes de la cytotoxicité des anthracyclines.....	4
3.1. Effet anti-topoisomérase II.....	5
3.2. Effet intercalant.....	6
3.3. Rôle des radicaux libres.....	7
4. Mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines.....	7
4.1. Hypothèse radicalaire.....	8
4.1.1. Le stress oxydatif.....	8
4.1.2. Formation d'espèces activées de l'oxygène lors du métabolisme des anthracyclines.....	8
4.1.2.1. Voie enzymatique.....	8
4.1.2.2. Voie non enzymatique.....	9
4.1.3. Formation d'espèces activées de l'azote par interactions entre les espèces radicalaires.....	10
4.2. Hypothèse des métabolites toxiques issus du métabolisme des anthracyclines.....	11
4.3. Sensibilité du cœur aux anthracyclines.....	12
5. Pharmacocinétique de la doxorubicine.....	12

Chapitre 2. La mitochondrie

1. Apoptose et nécrose : différents visages de la mort cellulaire.....	14
2. Machinerie apoptotique.....	15
2.1. Voie apoptotique intrinsèque.....	15
2.1.1. Modèle « PTP-induced mitochondrial swelling model ».....	15
2.1.2. Modèle « Formation of conducting channels model ».....	17
2.1.3. Nature du pore de transition de perméabilité (PTP).....	17
2.2. Voie apoptotique extrinsèque.....	18
3. Anthracyclines et mort cellulaire.....	19

Chapitre 3. Les acteurs du statut oxydant cellulaire

1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces radicalaires.....	20
1.1. Définition.....	20
1.2. Sources biologiques de radicaux libres.....	21
1.2.1. La chaîne respiratoire mitochondriale.....	21
1.2.2. Autres sources.....	22
1.2.2.1. Les enzymes leucocytaires.....	22
1.2.2.2. Les NAD(P)H oxydases non leucocytaires.....	22
1.2.2.3. Les xanthine oxydases/xanthine déshydrogénases.....	22
1.2.2.4. Les NO synthases.....	23
1.3. Radicaux libres rencontrés en biologie.....	23
1.3.1. Anion superoxyde.....	23

1.3.2. Peroxyde d'hydrogène.....	24
1.3.3. Formation du radical hydroxyle (HO [•]).....	25
1.3.4. Autres formes radicalaires.....	25
2. Potentialité toxique des espèces radicalaires.....	25
2.1. Acides gras.....	26
2.2. Acides nucléiques.....	27
2.3. Protéines.....	28

Chapitre 4. Systèmes de Ciblage et de Vectorisation

1. Définition de la vectorisation.....	29
2. Les liposomes.....	29
2.1. Principaux vecteurs liposomaux.....	30
2.1.1. Vecteurs ou liposomes de première génération.....	30
2.1.2. Vecteurs ou liposomes de deuxième génération.....	31
2.1.3. Vecteurs ou liposomes de troisième génération.....	32
2.2. Avantages des vecteurs liposomaux.....	32
2.3. Classification des liposomes.....	32
2.3.1. Les vésicules multilamellaires (multilamellar vesicles: MLV).....	32
2.3.2. Les petites vésicules unilamellaires (small unilamellar vesicles: SUV).....	33
2.3.3. Les grandes vésicules unilamellaires (large unilamellar vesicles: LUV).....	33
3. Potentialités thérapeutiques des liposomes.....	33
3.1. Définition du phénomène EPR.....	33
3.2. Bases physiopathologiques de l'effet EPR.....	34
3.3. Libération de la doxorubicine encapsulée.....	35
3.4. Liposomes à vocation thérapeutique.....	36

Chapitre 5. La propolis et ses polyphénols

I. La Propolis.....	37
1. historique de la propolis.....	37
2. Définition.....	37
3. Composition de la propolis.....	38
4. Données biologiques.....	38
4.1. Mécanisme d'action.....	38
4.2. Pharmacocinétique.....	38
4.3. Toxicité.....	38
II. Polyphénols et Flavonoïdes.....	39
1. Définition.....	39
1.1. Les polyphénols.....	39
1.2. Flavonoïdes.....	39
2. Structure et classification.....	39
2.1. Structure.....	39
2.2 Classification.....	40
3. Pharmacocinétique.....	40
4. Activités biologiques des flavonoïdes.....	41
4.1. Action anti-oxydante.....	41
4.1.1. Effet préventif.....	42
4.1.2. Effet briseur de chaîne ou « chain breaking ».....	42
4.2. Propriétés inhibitrices d'enzymes.....	42

Chapitre 6. Matériel et méthodes

A. Etude chimique de la propolis	43
1. Matériel.....	43
2. Extraction.....	43
2.1. Principe.....	43
2.2. Déroulement de l'extraction.....	43
2.3. Les flavonoïdes dans les extraits.....	44
2.3.1. Recherche qualitative.....	44
2.3.2. Recherche quantitative.....	44
3. Méthodes chromatographiques analytiques.....	45
3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM).....	45
3.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC/DAD-UV).....	45
4. Activité anti-radicalaire par le test au DPPH°.....	46
4.1. Principe.....	46
4.2. Déroulement de l'expérience.....	46
B. Partie galénique	46
1. Les lipides et liposomes.....	46
2. Méthodes.....	46
2.1. Fabrication des liposomes.....	47
2.1.1. Principe.....	47
2.1.2. Déroulement de l'expérience.....	47
2.2. Calibrage de la suspension de liposomes (Extrusion).....	48
2.2.1. Déroulement de l'expérience.....	48
2.3. Mesure de la taille des liposomes.....	48
2.3.1. Déroulement de l'expérience.....	49
2.4. Mesure du potentiel Zeta zêta (ζ).....	49
2.4.1. Déroulement de l'expérience.....	49
2.5. Encapsulation du principe actif.....	50
2.5.1. Principe.....	50
2.5.2. Déroulement de l'expérience.....	50
2.6. Détermination du taux d'encapsulation.....	51
2.7. Etude de la stabilité des liposomes.....	51
2.8. Microscopie électronique.....	51
2.8.1. Préparation et observation des liposomes vides et avec doxorubicine.....	52
C. Etude <i>in vitro</i>, cultures cellulaires	52
1. La lignée cellulaire.....	52
2. La culture des cellules H9c2.....	52
3. Etude de la toxicité de la doxorubicine <i>in vitro</i>	53
3.1. Test MTT (Tests de viabilité cellulaire).....	53
3.1.1. Principe.....	53
3.1.2. Déroulement de l'expérience.....	53
3.2. Test de la mort cellulaire.....	54
3.2.1. Principe.....	54
4. Etude de la capture cellulaire de la doxorubicine libre et encapsulée par les cellules H9c2.....	54
4.1. Préparation des cellules.....	55

4.2. Cytométrie de flux.....	56
4.3. Microscopie à fluorescence.....	56
D. Etude <i>in vivo</i>	57
1. Espèce animale utilisée.....	57
2. Conditions d'hébergement des animaux.....	57
3. Traitement.....	57
4. Dosages des enzymes sériques.....	58
5. Dosages tissulaires et étude de mitochondries.....	59
5.1. Dosages tissulaires.....	59
5.1.2. Dosage du glutathion (Sedlak et Lindsay, 1967).....	59
5.1.2.1. Déroulement de l'expérience.....	59
5.1.3. Dosage du MDA: Test TBARS (Ohkawa et al., 1978).....	59
5.1.3.1. Déroulement de l'expérience.....	60
5.2. Extraction des mitochondries de cœur.....	61
5.2.1. Déroulement de l'expérience.....	61
5.3. Dosage des protéines (Lowry 1951).....	61
5.3.1. Déroulement de l'expérience.....	61
5.4. Mesure de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries.....	62
5.4.1. Principe.....	62
5.4.1.1. Déroulement de l'expérience.....	62
5.6. Détermination de la concentration en cytochromes (a+a3, b, c, et c1) de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	62
5.6.1. Déroulement de l'expérience.....	63
5.7. Etude du gonflement mitochondrial ou swelling.....	64
5.7.1. Déroulement de l'expérience.....	64
6. Traitement statistique.....	64

Chapitre 7. Résultats et discussion

A. Etude Chimique de la propolis	65
1. Composition qualitative.....	65
2. Activité anti-radicalaire par le test au DPPH°.....	66
B. Formulation (galénique)	68
1. Taille des liposomes.....	68
2. Taux d'encapsulation.....	69
3. Stabilité et évolution dans le temps.....	70
4. Microscopie électronique.....	72
C. Etude <i>in vitro</i>	73
1. Viabilité cellulaire (Test MTT et test LDH).....	73
2. Analyse de la capture de la doxorubicine libre et encapsulée par les cellules.....	77
D. Etude <i>in vivo</i>	82
1. Effet de la doxorubicine sur le poids du cœur et le poids corporel.....	83
1.1. Evolution pondérale.....	83

1.2. Poids du cœur.....	84
2. Evaluation de l'effet de ROS sur le cœur.....	85
2.1. Peroxydation lipidique.....	85
2.2. Taux du glutathion.....	87
3. Effet de la doxorubicine sur les activités sériques de la CPK et LDH, TGO et TGP.....	89
4. Production de ROS de mitochondries isolées de cœur de rats Wistar.....	91
5. Swelling.....	93
6. L'effet de la doxorubicine sur la bioénergétique de Mitochondriale.....	94
7. Effet protecteur de la propolis.....	96
Conclusion.....	99
Références bibliographiques.....	101
Annexes.....	110

Travaux scientifiques

Liste des figures

Figure 1: Structure des anthracyclines.....	4
Figure 2: Mécanisme de toxicité cellulaire et structure moléculaire de la doxorubicine.....	6
Figure 3: Intercalation de la doxorubicine entre deux paires de bases azotées.....	7
Figure 4: Schéma des différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la doxorubicine.....	9
Figure 5: Production de radicaux libres oxygénés au cours de la transformation métabolique de la doxorubicine.....	10
Figure 6: Production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$).....	11
Figure 7: La machinerie apoptotique.....	16
Figure 8: Protéines impliquées dans la formation et/ou le contrôle PTP.....	17
Figure 9: Modèle structural du pore de transition de perméabilité.....	18
Figure 10: Production d'espèces ioniques et radicalaires.....	20
Figure 11: Formation de radicaux superoxydes en parallèle au métabolisme énergétique, par fuite d'électrons à partir de l'ubisemiquinone.....	24
Figure 12: Altération des constituants membranaires par les radicaux libres.....	26
Figure 13 : Mécanisme de l'auto-oxydation des acides gras par l'oxygène triplet et l'oxygène singulet.....	27
Figure 14: Représentation schématique d'un liposomes.....	30
Figure 15: Représentation schématique des quatre types de vecteurs liposomaux.....	31
Figure 16: Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille.....	33
Figure 17: Principe de l'effet EPR.....	34
Figure 18: Représentation schématique du Ciblage passif et sélectif ou effet EPR.....	35
Figure 19: Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone.....	39
Figure 20: Structures de base des principaux flavonoïdes.....	40
Figure 21: Molécule de Rhodamine B-DHPE.....	55
Figure 22: Chromatogramme HPLC de l'extrait de propolis mesuré par un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD-UV) à longueur d'ondes variables de 200 à 700nm.....	66
Figure 23: Cinétique de décoloration du DPPH° par l'extrait e propolis, vitamine E et al Quercétine suivie par la décroissance de l'absorption à 515 nm.....	67
Figure 24: Distribution de la taille des liposomes.....	68
Figure 25: Mécanisme de l'encapsulation active de la doxorubicine.....	69

Figure 26: Etude de la stabilité des liposomes vides en fonction du temps et sous différentes conditions ($p > 0.05$).....	71
Figure 27: Etude de la stabilité des liposomes chargés en fonction du temps et sous différentes conditions ($p > 0.05$).....	71
Figure 28: Microphotographies prises au microscope électronique à transmission de liposomes vides (A1 et A2) et chargé en doxorubicine (B1 et B2) après coloration négative avec du phosphotungstate 1%.....	72
Figure 29: Microphotographie prise au microscope électronique à transmission de liposomes vides après coloration négative avec du phosphotungstate 1%.....	73
Figure 30: Effet de la doxorubicine sur la viabilité des cellules cardiaques de rat H9c2.....	74
Figure 31: Effet de la doxorubicine sur la viabilité de cellules cardiaques de rats H9c2 après 20h d'incubation ($p < 0.001$).....	75
Figure 32: Effet de la doxorubicine sur la viabilité de cellules cardiaques de rats H9c2 après 20H d'incubation.....	75
Fig. 33: Effet de la doxorubicine sur la viabilité des cellules H9c2 en fonction du temps et de la concentration de doxorubicine.....	76
Figure 34: Effet de la doxorubicine sur la viabilité des cellules H9c2 en fonction du temps et de la concentration de doxorubicine.....	76
Figure 35: Viabilité des cellules H9c2 exposées à des doses croissantes de doxorubicine après 20h d'incubation.....	77
Figure 36: Histogrammes biparamétriques des cellules H9c2 visualisent ces dernières en fonction de leur taille (FSC) et de leur granulométrie (SSC) après 3h (histogrammes à gauche) et 20h (histogrammes à droite) d'incubation. Le nuage de points R1 correspond aux cellules H9c2 morphologiquement intactes et R2 correspond à des débris cellulaires.....	79
Figure 37: Analyse monoparamétrique de la fluorescence (FL2) après 3 heures (à gauche) et 20h (à droite) d'incubation des cellules H9c2 avec différentes formulations. Les histogrammes montrent le pourcentage d'évènements ou de cellules de la population R1 ayant captés la les formes testées par rapport à un témoin négatif.....	81
Figure 38: Microphotographies représentant des cellules H9c2 en interaction avec de la doxorubicine libre (à gauche) ou avec des liposomes chargés en doxorubicine (à droite) après 20 heures d'incubation.....	82
Figure 39: Effet de la doxorubicine sur le poids corporel (Témoins $p < 0.001$; Doxo $p < 0.01$, Lipo vides $P < 0.001$).....	83
Figure 40: Effet de la doxorubicine (30mg/kg) sur la prise alimentaire.....	84

Figure 41: Effet de la doxorubicine sur le poids du cœur 24h après l'administration IP d'une dose de 30mg/kg ($p>0.05$).....	85
Figure 42: Effet de la doxorubicine sur le taux de TBARS (Doxo-Témoins $p<0.001$; Doxo-Lipo $p<0.001$; Lipo-Témoins $p>0.05$). Alors que $p>0.05$ lorsque la dose de doxorubicine est e 20mg/kg.....	86
Figure 43: Effet de la doxorubicine sur le taux de glutathion tissulaire cardiaque (Doxo-Témoins $p<0.001$; Doxo-Lipo $p<0.01$;Lipo-Témoins $p>0.05$). Alors que $p>0.05$ lorsque la dose de doxorubicine est de 20mg/kg.....	88
Figure 44 : Effet d'une dose aigue de 30mg/kg de doxorubicine sur les activité sériques des enzymes CPK, LDH, TGO et TGP.....	90
Figure 45: Comparaison de production de ROS de mitochondries isolées de cœur de rats Wistar en présence de succinate comme substrat respiratoire et de roténone.....	91
Figure 46: Etude de l'effet de la doxorubicine sur le gonflement mitochondrial.....	93
Figure 47: Comparaison de la concentration en cytochromes de mitochondries isolées de cœur de rats Wistar soumis à différents traitements.....	95
Figure 48 : Effet d'une supplémentation orale en extrait de propolis sur le taux de TBARS (peroxydation lipidique) dans le cœur de rats traités par de la doxorubicine.....	97
Figure 49 : Effet d'une supplémentation orale en extrait de propolis sur la production d'anion superoxyde par des mitochondries isolées de cœurs de rats traités par de la doxorubicine.....	97

INTRODUCTION
GENERALE

Introduction Générale

La doxorubicine, antibiotique de type anthracycline est fréquemment utilisée dans le traitement des néoplasies. Cependant, cet agent thérapeutique induit de sévères altérations de la fonction cardiaque ce qui limite son utilisation dans la plupart des cas. La dose totale cumulative pouvant être utilisée est habituellement de 500 à 550 mg/m² à cause de la sévérité de l'insuffisance cardiaque directement corrélé à la dose totale de ce médicament.

Deux mécanismes principaux sont évoqués pouvant rendre compte de la physiopathologie de cette cardiomyopathie: une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium et une altération des membranes cellulaires et des différents composants intracellulaires, par la production d'espèces oxygénées réactives induites par la doxorubicine responsables d'une augmentation de la peroxydation lipidique endogène. Cette action délétère de l'anthracycline peut se manifester sous la forme de réactions en chaîne: formation de radicaux libres par la doxorubicine conduisant à une altération membranaire par le biais de la peroxydation lipidique, perte de la perméabilité sélective de la membrane et augmentation du calcium intracellulaire.

D'autre part, classiquement il est admis que le mécanisme principal de cytotoxicité des anthracyclines envers les cellules tumorales est lié à l'intercalation du médicament au niveau de l'ADN et à l'inhibition de l'enzyme nucléaire, la topoisomérase II. Or, cette enzyme est très peu exprimée dans les cellules quiescentes sur le plan prolifératif, comme le sont les cellules cardiaques. Ce constat a encouragé la recherche d'autres mécanismes susceptibles de rendre compte de la toxicité cardiaque.

Ainsi, l'hypothèse du développement d'un stress oxydatif induit par un traitement aux anthracyclines est incriminée dans les mécanismes de la toxicité cardiaque des anthracyclines. En outre, la mitochondrie semble jouer un rôle clé dans ce mécanisme. La meilleure connaissance du rôle de la mitochondrie dans la physiopathologie de l'induction de la mort cellulaire, conséquence de la production de ROS, laisse entrevoir d'intéressantes possibilités de protéger le myocarde.

Cette thèse de recherche relève de la problématique de l'amélioration des thérapies anti-cancéreuses existantes, basées sur les anthracyclines, au moyen d'une meilleure connaissance du mécanisme de cardiotoxicité de ces molécules et plus précisément l'interaction anthracyclines-mitochondries et la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS afin de permettre une meilleure utilisation de ces médicaments étant donné leur faible index thérapeutique. La présente étude vise à explorer l'interaction entre la doxorubicine et la mitochondrie afin d'élucider le rôle de cet organite dans la genèse de l'effet toxique sur le cœur.

C'est pour cela qu'on a jugé utile d'estimer ce stress à travers deux études. Etude in vivo, sur des rats males de souches wistar ayant reçus une dose aigue de doxorubicine, afin de pouvoir d'une part évaluer l'importance des altérations mitochondriales étant donné qu'il plus aisé d'isoler des mitochondries en quantité suffisante partir d'un tissu. D'autre part étudier l'effet protecteur de la propolis de la région de Jijel. En effet nous nous sommes intéressés à l'une de ses activités biochimiques, l'activité antioxydante.

L'autre étude in vitro, sur des cellules cardiaques de rat (H9c2) afin de pouvoir tester des doses croissantes de doxorubicine afin de pouvoir de déterminer le degré de sensibilité des mitochondries à la doxorubicine et quel type de mort cellulaire prédomine (apoptose ou nécroses).

Pour atteindre ces objectifs, nous avons présenté cette thèse en deux parties :

1°/ partie théorique : comportant 5 chapitre, l'un consacré aux anthracyclines (structure, mécanismes moléculaires d'action cytotoxique et cardiotoxique). Le 2ème chapitre traite de la mitochondrie comme organite de mort cellulaire, le 3ème met en relief les acteurs du statut oxydant cellulaire et leurs effets cytotoxique ; un autre chapitre sur la vectorisation et son intérêt dans la réduction de l'effet cardiotoxique et en fin le dernier chapitre à été consacré à la propolis et à ses flavonoïdes et leurs effets antioxydant.

2°/ partie pratique : passe en revue les matériels et méthodes employés afin de mener à bien notre étude :

- ❖ quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par le test TBARS (méthode indirect) sur homogénat de tissu cardiaque
- ❖ estimation du statut antioxydant du cœur
- ❖ isolement et étude du rôle de la mitochondrie dans la génération de ROS à l'aide des inhibiteurs spécifiques, il est possible d'étudier les différentes zones de productions de ROS de la chaîne respiratoire (Complexe I ou Complexe III), induites par leurs substrats respectifs (Glutamate/Malate ou Succinate).
- ❖ quantification de l'expression génique des cytochromes mitochondriaux cytochromes (a, a3, c, c1, b)
- ❖ évaluation de l'ouverture du pore de transition de perméabilité membranaire (swilling)
- ❖ encapsulation de la doxorubicine dans des liposomes de 2ème génération (stealth liposomes)

Le dernier chapitre expose l'ensemble des résultats obtenus avec interprétation et discussion.

CHAPITRE 1
LES ANTHRACYCLINES

Les Anthracyclines

1. Historique

Les premières anthracyclines ont été découvertes et isolées au début des années 60 presque simultanément en Italie, par **Di Marco** et ses collaborateurs des laboratoires **Carlo Erba**, et en France par **Dubost** et son équipe du laboratoire **Rhône-Poulenc** à partir de pigments produits par des bactéries du genre *Streptomyces* (*Streptomyces peuceticus* et *Streptomyces coeruleorubidis*) [Minotti et al., 2004 ; Robert, 2005 Takemura et al., 2007].

La première anthracycline fut appelée Rubidomycine par l'équipe française et Daunomycine par l'équipe italienne, mais l'étude de la structure de ces deux molécules montra qu'elles sont identiques. Pour tenir compte de cette double origine, le produit fut baptisé Daunorubicine, alors que la doxorubicine fut isolée quelques années plus tard en Italie et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974 [Hande, 1998]: on la considère comme le chef de file de ces médicaments [Weil, 1988]. Le suffixe « *rubicine* » rappelle leur couleur rouge intense [Pein et al., 1995].

La daunorubicine et la doxorubicine ont suscité de nombreux travaux de microbiologie et de chimie visant à obtenir de nouvelles anthracyclines d'efficacité antitumorale et/ou d'indice thérapeutique améliorés ainsi qu'une meilleure tolérance cardiaque [Lavelle, 1988]. Ainsi, plus d'une centaine d'anthracyclines d'origine naturelle et plus d'un millier, voire 2000 analogues, ont été obtenus par hémisynthèse (introduction de modifications chimiques, de substitution et/ou conjugaison au niveau du noyau tétracyclique de la chaîne latérale ou sur la daunosamine) et par synthèse totale sont actuellement connus [Lavelle, 1988 ; Minotti et al., 2004], mais peu d'entre eux sont entrés en pratique clinique tel que l'epirubicine et l'idarubicine, considérée comme les alternatifs de la doxorubicine et de la daunorubicine respectivement [Hande, 1998 ; Minotti et al., 2004].

2. Structure des anthracyclines

Les anthracyclines possèdent la structure polyaromatique des tétracyclines, avec un aminosucre, la daunosamine, qui est attachée par une liaison glycosidique (Figure 1). Les agents cytotoxiques de cette classe ont tous une structure quinone et hydroquinone, qui leur permet de fonctionner comme accepteur et donneur d'électrons [Hortobágyi, 1997 ; Chabner et al., 2006].

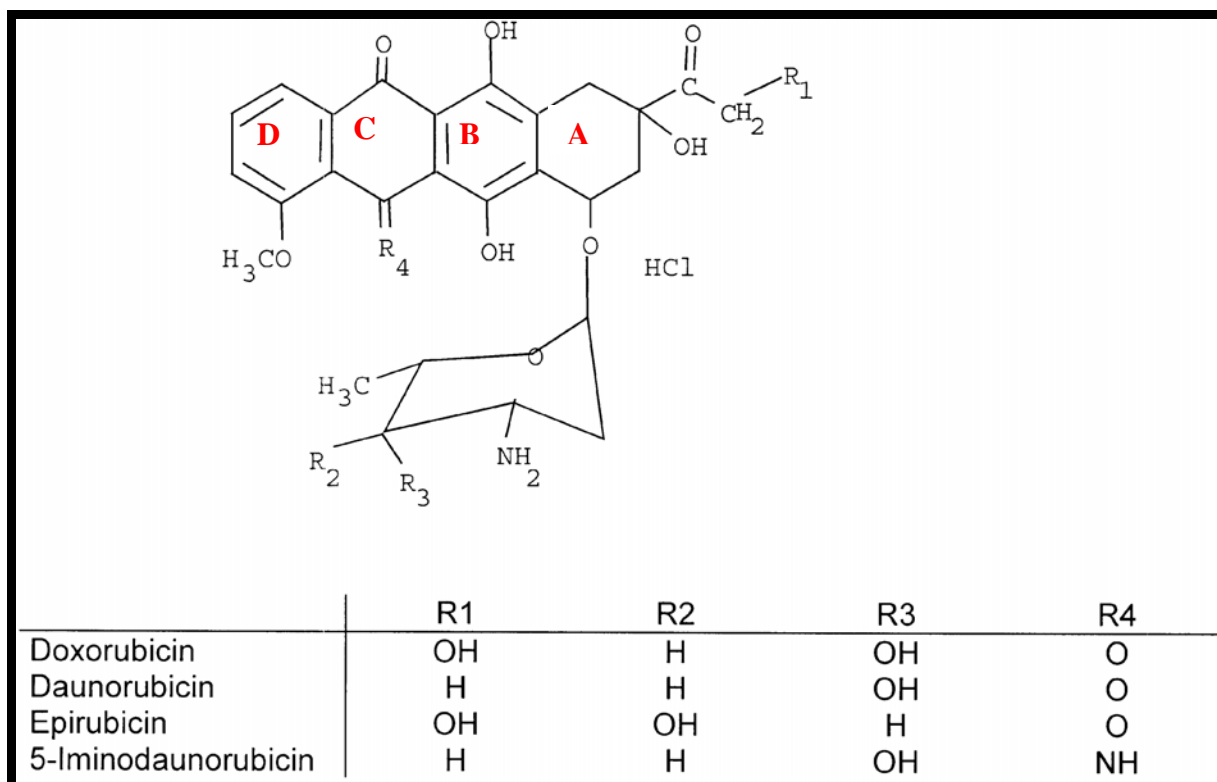


Fig.1: Structure des anthracyclines. On notera la faible modification du radical R1 en radical H pour d'autres formes d'anthracyclines (daunorubicine), et l'inversion des radicaux -OH et -H, transformant le sucre associé à la structure plane polycyclique de la doxorubicine, pour obtenir l'épirubicine qui serait moins cardiotoxique [Jung et Reszka, 2001].

Comme les autres anthracyclines, la doxorubicine est une molécule amphipathique dont la structure comporte également deux parties : une génine ou partie aglycone et un sucre ou glycone. La partie aglycone (adriamycinone : $C_{21}H_{18}O_9$) représente la moitié insoluble dans l'eau et, consiste en un noyau de 4 cycles accolés désignés par les lettres A, B, C et D. Ce noyau tétracyclique, responsable du caractère coloré des anthracyclines (groupe chromophore), porte des groupes quinones et hydroquinones adjacents sur les cycles C et B ; le cycle D porte un substituant méthoxy sur le carbone 13.

La partie glycone, soluble dans l'eau, de nature basique est un sucre aminé (osamine) réduit appelé daunosamine (3-amino-2,3,6 trideoxy-L-fucosyl) lié au carbone 7 du cycle A par une liaison osidique [Minotti et al., 2004 ; Abraham et al., 2005].

3. Mécanismes de la cytotoxicité des anthracyclines

Malgré leur large utilisation en chimiothérapie anticancéreuse, les mécanismes de cytotoxicité de ces antibiotiques demeurent sujets de controverse. Cependant, ils peuvent se résumer en quatre principaux [Minotti et al., 2004 ; Takemura et al., 2007] :

- ❖ intercalation dans la molécule d'ADN responsable de l'inhibition de la synthèse de la macromolécule.
- ❖ inhibition de l'enzyme topoisomérase II, responsable d'une double cassure de la molécule.
- ❖ génération de radicaux libres oxygénés ou ROS, responsables de l'altération de l'ADN et de la peroxydation lipidique.
- ❖ une toxicité directe sur les membranes cellulaires est aussi décrite, avant même la pénétration dans la cellule, en raison d'une haute affinité des anthracyclines avec certains lipides membranaires.

L'induction de l'un ou de plusieurs de ces mécanismes dépend de la concentration du médicament utilisée. La majorité de ces mécanismes de cytotoxicité ont été observés *in vitro* après utilisation de fortes concentrations de médicament, autrement dit utilisation de doses supracliniques. Cependant l'utilisation *in vitro* de doses cliniques (faibles) d'anthracyclines montre que le mécanisme anti-topoisomérase II et secondairement, l'effet intercalant, sont de loin les mécanismes responsables des effets cytotoxiques observés *in vivo* [Minotti et al., 2004 ; Takemura et al., 2007].

3.1. Effet anti-topoisomérase II

Les topoisomérases sont des enzymes qui permettent la séparation des brins d'ADN lors des phases de transcription, de réplication et de réparation. Ces topoisomérases sont de deux types : la topoisomérase I, qui crée une rupture monocaténaire et la topoisomérase II (TPII), qui coupe les deux brins de l'ADN. La relaxation de la molécule d'ADN est suivie d'une religation du ou des deux brins coupés, après avoir modifié l'enroulement de la double hélice [Minotti et al., 2004].

Les anthracyclines agissent en stabilisant un intermédiaire de réaction (complexe ternaire ADN-TPII-Anthracycline) dans lequel les brins d'ADN, après être coupés par la topoisomérase II, sont liés de façon covalente aux résidus tyrosine de la topoisomérase II pour former un complexe binaire labile ADN-TPII. Ceci permet à l'ADN de passer de la forme double brin superenroulée à la forme monobrin détendue. Après ce changement de conformation, la TPII relie de nouveau les deux brins. Les anthracyclines forment un complexe ternaire stable avec l'enzyme et l'ADN scindé, empêchant ainsi la soudure des brins d'ADN. La non réparation de cette cassure conduit à l'apoptose : *c'est le mode principal d'action des anthracyclines* [Chabner et al., 2006] (Figure 2).

Des travaux ont montré que la doxorubicine ainsi que d'autres anthracyclines inhibent également la topoisomérase I. Cependant cette inhibition entraîne un effet cytotoxique ou antitumoral très faible dépendant de la concentration cellulaire en topoisomérase I, ce que suggère que l'effet anti-topoisomérase I représente un mode d'action auxiliaire des anthracyclines [Guano et al., 1999].

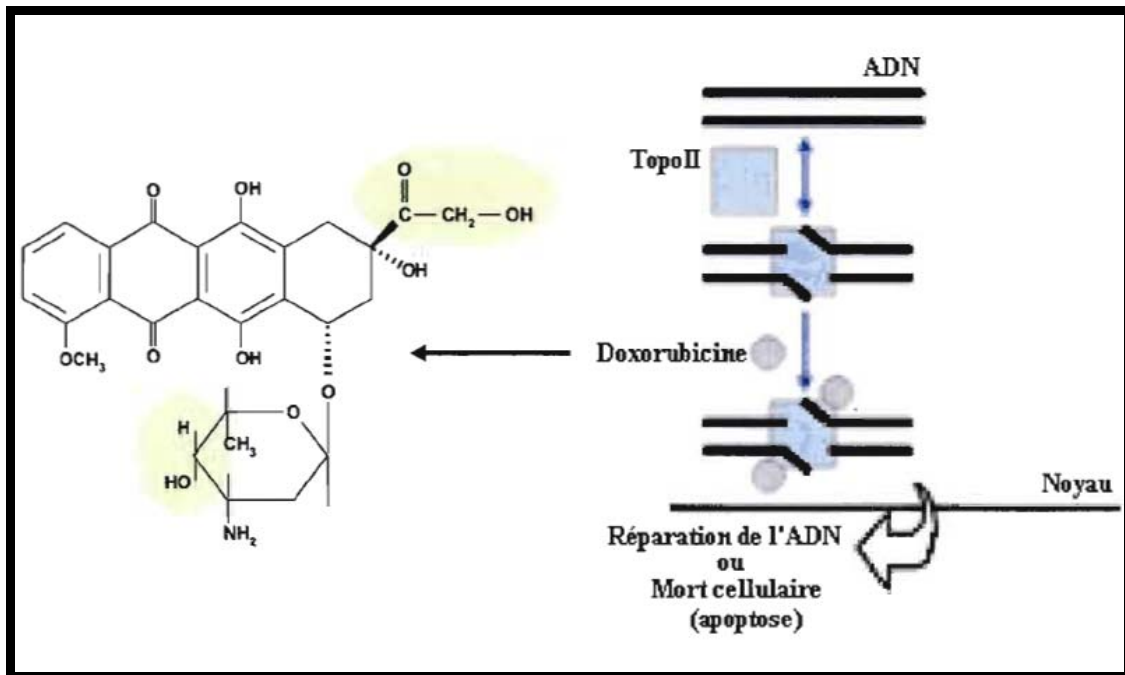


Fig.2: Mécanisme de toxicité cellulaire et structure moléculaire de la doxorubicine : La stabilisation et l'inhibition de l'activité de l'enzyme topoisomérase II par la doxorubicine mène à l'arrêt du cycle cellulaire qui permet l'activation de la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire par apoptose, si les dommages à l'ADN sont irréparables [Hande, 1998 ; Tsuruo et al., 2003].

3.2. Effet intercalant

Le terme d'intercalation décrit le processus par lequel des molécules viennent s'insérer entre deux paires de bases d'ADN et d'y contracter des liaisons de haute affinité. Les médicaments qui exercent leurs effets de cette manière doivent être des molécules plates en vue de pouvoir se positionner entre les paires de bases, de sorte qu'il s'agit essentiellement de composés aromatiques ou hétéroaromatiques. Certains médicaments s'insèrent dans l'hélice via le sillon correspondant au grand pas, alors que d'autres choisissent l'approche par le petit pas [Patrick et Depovere, 2002].

La structure plane en partie de la doxorubicine (cycle B, C, et D), lui permettrait de s'insérer, via le grand sillon de la double hélice, entre deux paires de bases azotées au niveau de la guanine du côté 5' (5'-GCN) [Cutts et Phillips, 1995; Hande, 1998; Iarussi et al., 2001]. De cette intercalation, résulte un dédoublement de l'espace entre les deux brins de DNA (Figure 3).

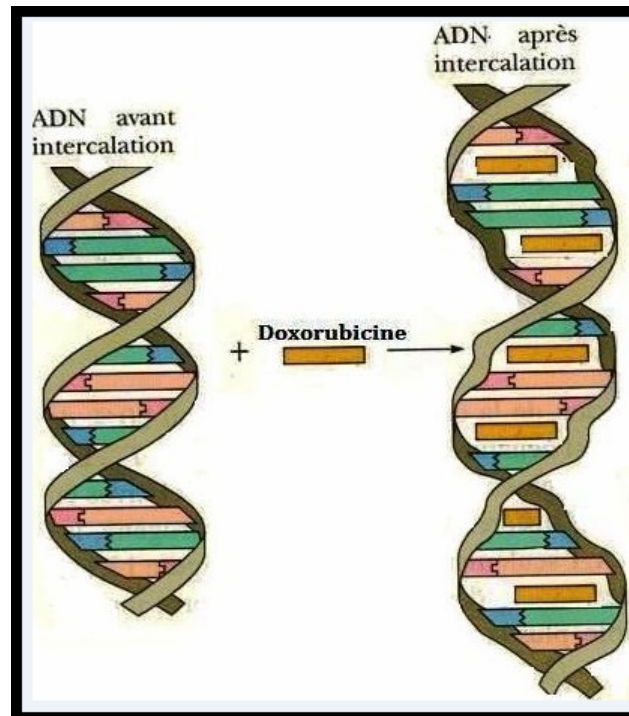


Fig.3: l'intercalation de la doxorubicine entre deux paires de bases azotées, perpendiculairement à l'axe de l'hélice et provoquant une distorsion de celle-ci responsable de l'arrêt de la réplication [Garret et Grisham, 2000].

Cet espace accru, induit une détorsion du DNA surperenroulé, et une modification de la topologie des bases nucléaires empêchant la réplication et la transcription [Patrick et Depovere 2002; Minotti et al., 2004], responsables de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G2 par activation de «check points», responsables d'activer la réparation de l'ADN ou si les dommages sont trop importants, d'activer la mort de la cellule par apoptose [Minotti et al., 2004].

3.3. Rôle des radicaux libres

La formation des radicaux libres est jugée déterminante pour expliquer la toxicité cardiaque mais non la cytotoxicité antitumorale. Elle aboutit à la peroxydation des lipides des membranes mitochondriales et du réticulum sarcoplasmique par liaison avec le diphosphatidyl-glycérol [Pein et al., 1995; Singal et al., 2001]

4. Mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines

La cardiotoxicité est un des désavantages majeurs de l'utilisation de la doxorubicine comme agent anticancéreux. En effet, ce médicament anticancéreux, administré à des doses totales cumulées de 550 mg/m² entraînerait des problèmes cardiaques chez plus de 7 % des patients traités. Le mécanisme impliqué reste irrésolu, cependant les radicaux libres produits par la doxorubicine seraient majoritairement responsables de la cardiotoxicité [Iarussi et al., 2001 ; Minotti et al., 2004].

4.1. Hypothèse radicalaire

4.1.1. Le stress oxydatif

Les radicaux libres de l'oxygène constituent des espèces certes réactives, mais indispensables au fonctionnement de l'organisme. Malgré leur caractère dangereux, l'organisme les maîtrise par un ensemble de molécules pièges dont les vitamines antioxydantes et d'enzymes comme les superoxydes dismutases et les peroxydases. Malheureusement ce système de contrôle peut se dérégler, dans un type cellulaire ou un tissu précis, par suite d'une surproduction massive (inflammation, irradiation, intoxication) ou d'un effondrement des défenses endogènes par suite de carences en micronutriments antioxydants ou d'anomalies génétiques des enzymes antioxydants. : **«le stress oxydant va donc résulter d'un déséquilibre de la balance anti et pro-oxydants»** [Favier, 1997].

4.1.2. Formation d'espèces activées de l'oxygène lors du métabolisme des anthracyclines

Le métabolisme de la doxorubicine entraîne l'apparition de ROS, principalement l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle HO^{\cdot} . Ces ROS sont créés par deux voies différentes : la voie enzymatique impliquant la mitochondrie et faisant intervenir les flavines réductases placées au niveau de la membrane mitochondriale et la voie non enzymatique par la réaction d'Haber-Weiss [Petit, 2004 ; Vander Heide et al., 2007].

4.1.2.1. Voie enzymatique

Les anthracyclines sont capables d'induire une production accrue de radicaux libres oxygénés du fait de leur structure de type quinone, pouvant subir une réduction par addition d'un électron, catalysée par les flavines réductases (NADPH-cytochrome P-450 réductase, NADH déshydrogénase), pour aboutir à la formation d'un dérivé semi-quinone radicalaire. Ce dérivé peut lui-même subir une réduction en hydroquinone, ou retourner à la forme quinone en cédant son électron célibataire à l'oxygène moléculaire, produisant ainsi des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) [Delemasure et al., 2006] (Figure 4).

En l'absence de métaux de transition libres (fer, cuivre), les radicaux $O_2^{\cdot-}$ ne sont pas très toxiques pour les structures environnantes, car ils sont normalement transformés ou réduits en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène moléculaire (O_2) par la superoxyde dismutase (SOD). Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé, composé toxique, est pris en charge et par la catalase (CAT) qui le converti en eau et en oxygène ou par la glutathione peroxidase (GSH-PX) qui inactive ce composé en le réduisant en eau grâce au glutathion (GSH) qui est converti en glutathion oxydé (GS-SG) [Myers, 1998 ; Minotti et al., 2004].

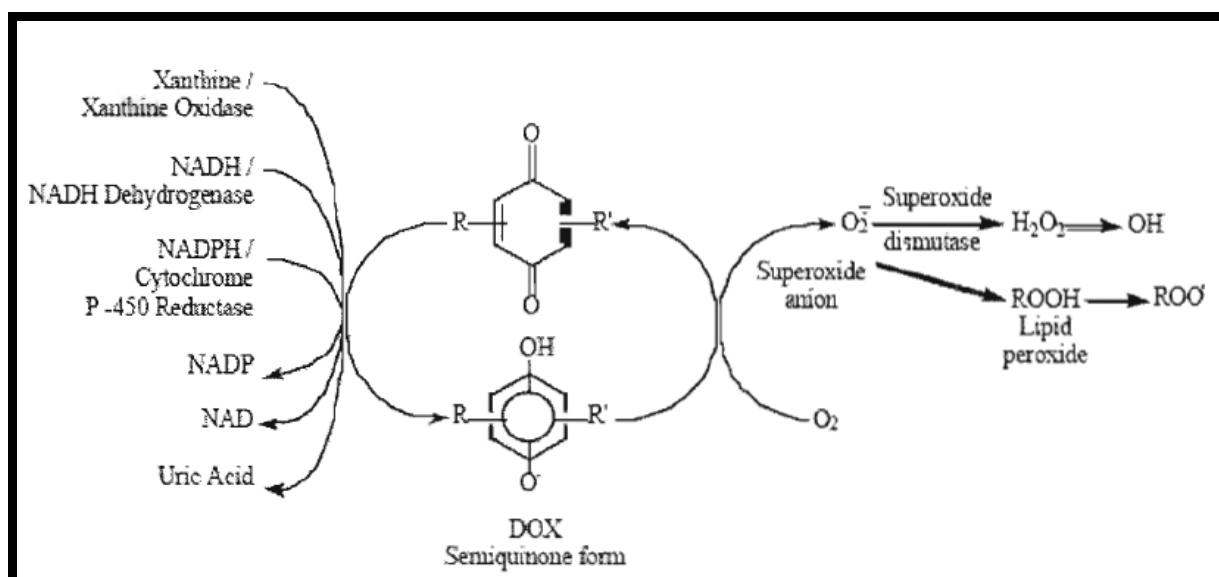


Fig.4: Schéma des différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la doxorubicine : La forme quinone est la forme initiale de la doxorubicine et peut être réduite en forme semiquinone par le gain d'un électron. Cette réduction peut être générée par des enzymes réductases telles que la xanthine oxydase, la NADH déshydrogénase et la NADPH cytochrome P-450 réductase. L'électron perdu par la semiquinone de la doxorubicine lors de son oxydation peut être transféré à une molécule d'oxygène (O_2) pour former l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui sera également oxydé par la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). A ce stade, le H_2O_2 peut entraîner la formation de radicaux hydroxyles (HO^{\bullet}), un des radicaux libres les plus réactifs et destructifs, mais peut aussi être éliminé par la catalase et la glutathion peroxydase [Iarussi et al., 2001].

Cependant, en raison de la concentration relativement basse de CAT dans le tissu cardiaque, il en résulte une accumulation de radicaux $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 , à l'origine d'une production accrue de radicaux hydroxyles (HO^{\bullet}) par la voie de Fenton et de Haber-Weiss (voire plus bas) [Myers, 1998 ; Minotti et al., 2004].

4.1.2.2. Voie non enzymatique

Une deuxième voie de génération de radicaux libres oxygénés par les anthracyclines fait intervenir la formation d'un complexe organométallique entre les anthracyclines et quelques métaux de transition comme Fe_3^+ , Cu_2^+ , Mg_2^+ et Zn_2^+ , étant donné que le radical semi-quinone des anthracyclines est un réducteur de métaux [Myers, 1998].

Théoriquement, la doxorubicine, comme beaucoup de dérivés d'anthracyclines, a trois sites possibles de liaison pour les métaux: un site représenté par l'atome d'azote de la daunosamine, et les deux autres sites sont l'oxygène du noyau quinone et l'oxygène du groupe phénol [Jung et Reszka, 2001].

Parmi ces métaux, le Fer est de loin le cofacteur métallique le plus important catalysant la génération non enzymatique de ROS dans les réactions de Fenton et de Haber-Weiss [Vander Heide et L'Ecuyer, 2007] :



Au sein de la cellule, l'ion ferrique Fe_3^+ libre, libéré de ses sites de stockage transferrine et ferritine par l'attaque des anthracyclines, se lie à trois molécules d'anthracyclines pour former un complexe très stable : $\text{Fe}_3^+(\text{anthracycline})_3$. Ce complexe peut subir un cycle interne d'oxydoréduction, donnant naissance à un complexe radicalaire $\text{Fe}_2^+(\text{anthracycline})_3$. Ce dernier peut céder son électron supplémentaire à l'oxygène moléculaire et aboutir ainsi à la formation de radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ [Minotti et al., 2004 ; Petit, 2004]. Ainsi, la formation de radicaux libres oxygénés est indépendante de toute activité enzymatique (Figure 5).

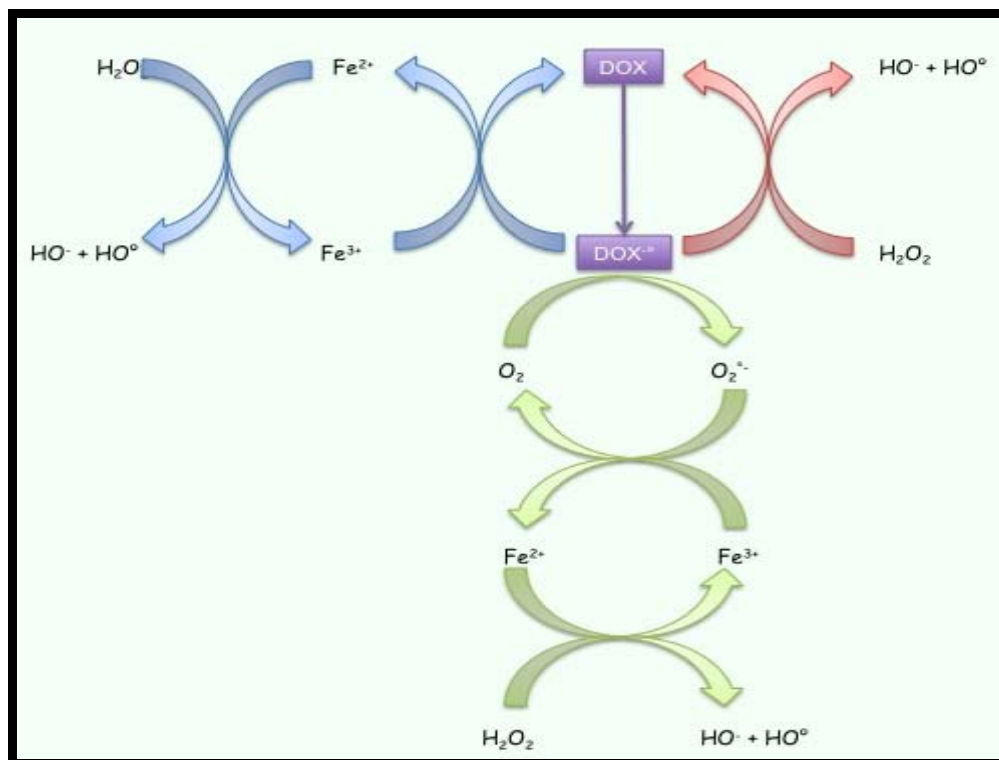


Fig.5: Production de radicaux libres oxygénés au cours de la transformation métabolique de la doxorubicine. Trois mécanismes ont été proposés dans la production de radical hydroxyle par le radical semi-quinone de la doxorubicine (indiqués par trois couleurs différentes sur le schéma) [Muindi et al., 1985].

4.1.3. Formation d'espèces activées de l'azote par interactions entre les espèces radicalaires

Du fait du contexte inflammatoire induit par les anthracyclines, une grande quantité de monoxyde d'azote (NO) est produite à partir de la L-arginine grâce à l'activation de la forme inductible des NO synthases (iNOS) présente au niveau des macrophages et des cellules vasculaires. Il s'agit d'une molécule radicalaire non chargée, dont l'électron libre est porté par l'azote. De plus, les anthracyclines peuvent être réduites par le domaine réductase des NOS endothéliales (eNOS) en

dérivé radicalaire semi-quinonique qui, en présence d'oxygène moléculaire (Figure 6), peut conduire à la formation d' $O_2^{\cdot-}$. Il a été démontré que la production concomitante de grandes quantités d' $O_2^{\cdot-}$ et de NO pouvait induire la formation de peroxyneutre (ONOO⁻), qui pouvait lui-même générer le radical OH indépendamment de la mise en jeu des processus faisant intervenir le fer [Vergely et Rochette, 2003 ; Delemasure et al., 2006].

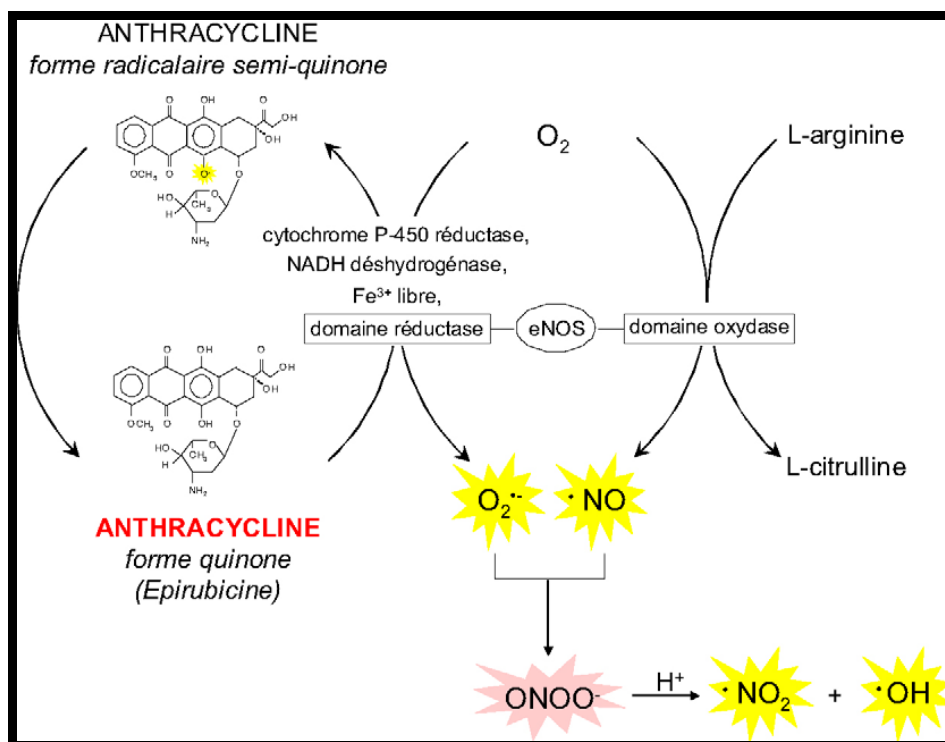


Fig.6: Production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines et formation de peroxyneutres (ONOO⁻), issus de la production concomitante d' $O_2^{\cdot-}$ et de monoxyde d'azote (NO) par les anthracyclines [Delemasure et al., 2006].

4.2. Hypothèse des métabolites toxiques issus du métabolisme des anthracyclines

La cardiotoxicité des anthracyclines pourrait aussi être liée à la formation de métabolites toxiques directement issus du métabolisme de ces molécules.

Par exemple, les alcools secondaires comme le doxorubicinol, daunorubicinol, ou épirubicinol, métabolites de la doxorubicine, de la daunorubicine et de l'épirubicine respectivement, formés dans le cytosol par réduction du groupement carbonyle en C₁₃ de leur chaîne latérale par des carbonyl-réductases cytoplasmiques NADPH-dépendantes seraient moins actifs sur le plan tumoral mais plus toxiques sur le cœur que leurs précurseurs [Minotti et al., 2004]. Ces métabolites entraînent une cardiotoxicité selon des mécanismes fer-dépendants ou non.

- ❖ Pour les mécanismes fer-indépendants, ces alcools sont capables d'inhiber certaines ATPases Ca_2^+ dépendantes du réticulum sarcoplasmique, des mitochondries et du sarcolemme telles que $Ca_2^+-Mg_2^+-ATPase$, la $Na^+-K^+-ATPase$ et la pompe à proton (f0-f1). Ainsi une fois formés

dans les cellules, ces métabolites pourraient par leurs actions propres membranaires altérer les mouvements ioniques, en particulier les transferts calciques [Minotti et al., 2004].

- ❖ Pour les mécanismes de toxicité fer-dépendants, ces métabolites (à doses aiguës) entraînent la conversion de l'aconitase cytosolique (enzyme catalysant l'isomérisation du citrate en isocitrate) en protéine fer-régulateur. La libération du fer à partir de son groupe prosthétique la convertit en protéine fer-régulateur, ce qui permet d'augmenter le pool du fer libre dans les cellules. Ce mécanisme, ayant lieu spontanément dans les cellules carencées en fer, représente un processus adaptatif pour restaurer les fonctions métabolique nécessitant des taux de fer normaux; le même processus est extrêmement toxique, si la conversion aconitase en protéine fer-régulateur est induite par la doxorubicine, car le fer libre favorise la réaction de Fenton et de Haber-Weiss [Minotti et al., 2004].

4.3. Sensibilité du cœur aux anthracyclines

La sensibilité particulière du cœur aux anthracyclines serait liée à des particularités spécifiques du tissu cardiaque.

Les cardiomyocytes sont des cellules musculaires très différenciées pour un métabolisme oxydatif très poussé d'où le déficit relatif en défenses antioxydantes par rapport aux autres tissus se traduisant par un taux relativement bas de SOD et de catalase et un faible taux de renouvellement du glutathion, d'où l'incapacité des cellules cardiaques à inactiver l'ensemble des radicaux libres produits par les anthracyclines [Andrieu-Abadie, 1999 ; Vander Heide et L'Ecuyer, 2007].

En outre, la doxorubicine entraîne une inactivation de la glutathion peroxydase-1 (GSH-Px1), enzyme qui détoxifie la plupart du H_2O_2 en raison de son bas K_m pour ce dernier [Minotti et al., 2004] alors que la catalase est moins efficace que la GSH-Px1 aux faibles concentrations de H_2O_2 ; l'inactivation de GSH-Px1 par la doxorubicine éliminerait donc une défense importante contre le cycle redox de la doxorubicine favorisant ainsi l'amorçage de l'apoptose par H_2O_2 .

Enfin, les cellules myocardiques sont très riches en mitochondries (représentent 50% du poids du cœur) [Myers, 1998] d'où la présence d'un taux élevé dans les cardiomyocytes de cardiolipides, phospholipides constitutifs de la membrane mitochondriale interne; l'affinité élevée de la doxorubicine pour les cardiolipides explique l'accumulation importante de la doxorubicine à l'intérieur des cellules cardiaques [Goormaghtigh et al., 1990].

5. Pharmacocinétique de la doxorubicine

Après administration par voie intraveineuse, la doxorubicine quitte rapidement le plasma sanguin pour se fixer sur les tissus sous forme active non métabolisée (principalement les reins, le foie, la rate, le cœur et les poumons). Cependant, le foie reste l'organe majeur où la doxorubicine

s'accumule alors que son taux au niveau du cœur est similaire aux autres organes. La liaison aux protéines plasmatiques est importante, elle de 75-85% [Robert, 2005].

La doxorubicine n'est que partiellement métabolisée. Son métabolisme a lieu aussi bien dans le foie que de manière extra-hépatique. Il s'agit essentiellement d'une réduction de la molécule en un alcool secondaire actif dihydrogéné le doxorubicinol par une aldo-cétoréductase NADPH-dépendante cytosolique (cétoréductase) [Robert, 2005 ; Marcot et al., 1997].

La doxorubicine se caractérise chez l'homme par une décroissance des concentrations plasmatiques en fonction du temps, bi- ou triphasique et par une demi-vie d'élimination terminale d'environ 30-36H [Robert, 2005 ; Marcot et al., 1997]. L'élimination triphasique correspondant respectivement au captage tissulaire, au métabolisme du médicament au niveau du foie en doxorubicinol et la troisième phase serait attribuable au relâchement ou relargage du médicament des sites de liaison dans les tissus. Les demi-vies correspondantes sont de 10 à 30 minutes, de 10 heures et de 24 à 48 heures [Marcot et al., 1997 ; Lauzon, 2008].

La doxorubicine et ses métabolites sont majoritairement excrétés par voie biliaire, à raison de 40-50% sous forme inchangée et de 23% sous forme de doxorubicinol en 7 jours [Robert, 2005 ; Marcot et al., 1997].

L'élimination rénale est minime, moins de 5% de la dose administrée par voie intraveineuse sont éliminés dans les urines en 5 jours et environ 25% en une semaine, principalement sous forme de produit inchangé ce qui expliquerait la coloration rouge de l'urine [Marcot et al., 1997 ; Lauzon, 2008].

CHAPITRE 2
LA MITOCHONDRIE

Mitochondrie

Le mot apoptose est retrouvé pour la première fois dans les écrits d'**Hippocrate** de **Cos**, ce dernier utilisa ce terme pour décrire la gangrène survenant sur des fractures traitées par bandage [Diamantis et al., 2008], mais c'est par les travaux de **Kerr**, **Wyllie** et **Curie** en 1972 que la mort cellulaire programmée a connu un regain d'intérêt [André et al., 2006]. Par ce terme, signifiant en grec « *la chute des feuilles* » en automne, un type de mort cellulaire différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire caractérisée jusqu'alors, fut décrit.

En réalité, au moment où le mot est introduit, l'apoptose était déjà connue mais faisait l'objet de descriptions disparates (nécrose acidophile ou corps de **Councilman** pour les anatomopathologistes) et était plutôt considérée comme une curiosité morphologique inexplicée [Marchetti, 2005].

1. Apoptose et nécrose : différents visages de la mort cellulaire

L'apoptose ou mort cellulaire programmée peut être définie par rapport à un autre type de mort cellulaire appelé nécrose. Cette dernière est la conséquence passive d'une agression de la cellule alors que l'apoptose est parfaitement intégrée dans les processus physiologiques normaux de la cellule.

L'apoptose est une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères. Elle joue un rôle central dans le développement et dans le maintien de l'homéostasie. Elle est impliquée dans le renouvellement tissulaire et le développement du système nerveux. Elle participe notamment à l'élimination de cellules surnuméraires, lors du développement embryonnaire. Toute anomalie de l'apoptose peut être responsable du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologies. Une résistance accrue entraîne l'apparition de maladies comme les cancers; à l'inverse, un excès d'apoptose participe à l'émergence de maladies neurodégénératives ou de syndromes d'immunodéficiences comme le SIDA [Marchetti, 2005 ; André et al., 2005 ; Diamantis et al., 2008].

La nécrose est une mort «désordonnée» et accidentelle. Elle se caractérise par une augmentation du volume cellulaire, la perte précoce de l'intégrité membranaire et la dispersion du contenu cellulaire provoquant une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant. Par opposition, l'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée rapide (quelques heures) et discrète mettant en œuvre une véritable machinerie interne de destruction de la cellule, procédant par différentes phases chronologiques. En dépit de ces différences fondamentales, l'apoptose et la nécrose représentent les visages extrêmes et opposés d'un unique processus de mort cellulaire [Marchetti, 2005].

Entre ces deux représentations opposées de la mort, il pourrait exister une multitude de types de mort, appelée nécrapoptose, paraptose, abortose, partageant, à des degrés divers, certaines caractéristiques apoptotiques et nécrotiques [Lemasters et al., 2002].

2. Machinerie apoptotique

L'apoptose ou mort cellulaire programmée peut être divisée en trois phases : *une phase de mise en route* induite par un stimulus, *une phase effectrice* ou point de «non retour» et *une phase de dégradation* se traduisant par d'ultimes altérations cytosoliques, membranaires et nucléaires. La phase effectrice de l'apoptose consistait en l'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP) des mitochondries et la libération de protéines apoptogènes [Brenner et al., 1998].

Parmi les divers signaux apoptotiques induits par des stimuli endogènes ou exogènes, 2 voies principales se dessinent : une voie intrinsèque et une voie extrinsèque (Figure 7).

2.1. Voie apoptotique intrinsèque

De nos jours, il est clairement établi que la mitochondrie, organite producteur de l'énergie de la cellule (ATP), joue un rôle clé dans l'apoptose. Son intervention dans ce processus ne s'explique pas par une «simple perte de fonction» ayant pour conséquence un déficit énergétique, mais est reconnue plutôt comme un mécanisme actif s'accompagnant de profondes altérations. On observe une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale -liée à une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)- et la libération dans le cytoplasme de protéines apoptogènes comme le cytochrome c [Bernardi et al., 2006].

Il existe actuellement au moins deux mécanismes pouvant expliquer la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MME):

2.1.1. Modèle «PTP-induced mitochondrial swelling model»

Observé lors de l'apoptose comme de la nécrose se caractérisé par l'ouverture irréversible d'un mégacanal non sélectif appelé pore de transition de perméabilité (PTP) situé aux points de contacts entre les membranes mitochondriales externes et internes. Ce concept implique que l'agent apoptotique interagisse directement avec le PTP, provoquant son ouverture, puis une dépolarisation rapide de la mitochondrie et un gonflement de la matrice, une rupture de la membrane externe mitochondriale, et par conséquent le relargage des facteurs apoptogènes comme le cytochrome c, l'AIF (Figure 8, panneau gauche). L'ouverture du PTP est régulée par la famille de Bcl-2. Ainsi, la protéine proapoptotique Bax est capable de favoriser la transition de perméabilité tandis que Bcl-2 prévient l'ouverture du pore [Schmitz et al., 2000 ; Armstrong, 2006 ; André et al., 2006].

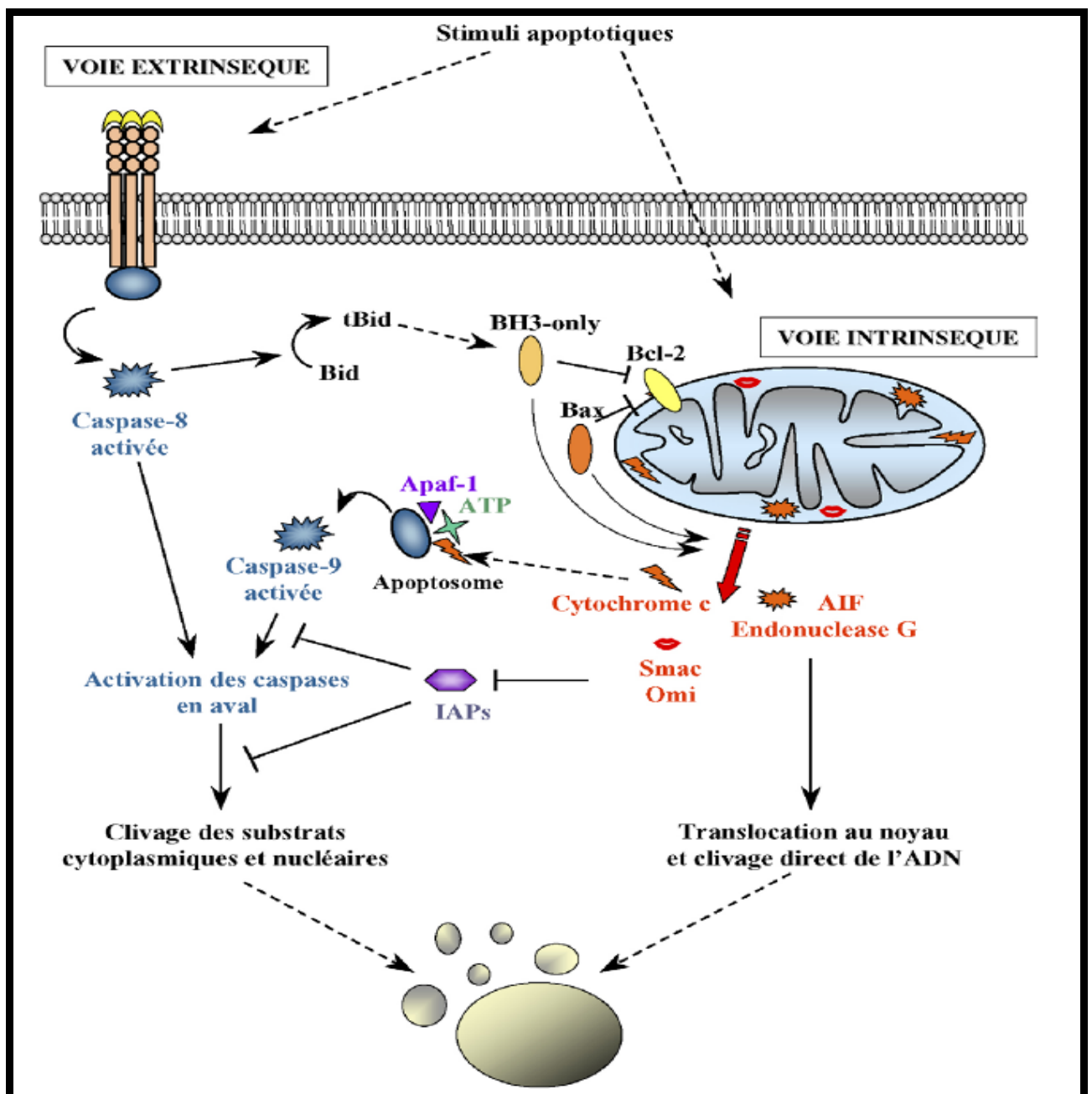


Fig.7 : La machinerie apoptotique. L'activation de la voie des récepteurs de mort, par liaison de leurs ligands spécifiques, résulte directement en l'initiation de la cascade des caspases sans implication de la mitochondrie. L'activation de la voie intrinsèque mène à la perméabilisation mitochondriale et ainsi à la libération des facteurs proapoptotiques. Le cytochrome c va alors s'intégrer à l'apoptosome pour induire l'activation de la caspase-9. Les facteurs SMAC (Second Mitochondrial Activator of Caspases) et Omi favorisent l'activation de la cascade des caspases en levant l'inhibition exercée par les IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins). La voie intrinsèque peut également opérer par un mécanisme indépendant des caspases, impliquant la translocation directe au noyau de AIF (Apoptosis Inducing Factor) et de l'endonucléase G. Les membres antiapoptotiques (Bcl-2-like) de la famille Bcl-2 (B Cell Leukemia) maintiennent l'intégrité membranaire des mitochondries, tandis que les membres proapoptotiques (Bax-like et BH3-only) déclenchent sa perméabilisation sous l'effet des stimuli apoptotiques. Bid, activé sous une forme tronquée (par la caspase-8), constitue un lien entre les deux voies de signalisation. Autre Abréviation utilisée : APAF1, Apoptotic Protease Activating Factor 1 [André et al., 2006].

2.1.2. Modèle « Formation of conducting channels model »

Mettrait en jeu des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Figure 8, panneau droit). Ces protéines sont capables de s'insérer dans la MME où une fois oligomérisées, elles forment des pores de façon autonome. Plusieurs exemples sont connus : le pore Bax (comportant 4 molécules Bax), le pore Bax/Bid ou le pore Bax/VDAC. La translocation spécifique du cytochrome c à travers ces canaux, a été également décrite [Schmitz et al., 2000 ; André et al., 2006].

Il n'est bien sûr pas exclu que plusieurs modèles coexistent et qu'ils interviennent spécifiquement en fonction du stimulus apoptotique [André et al., 2006].

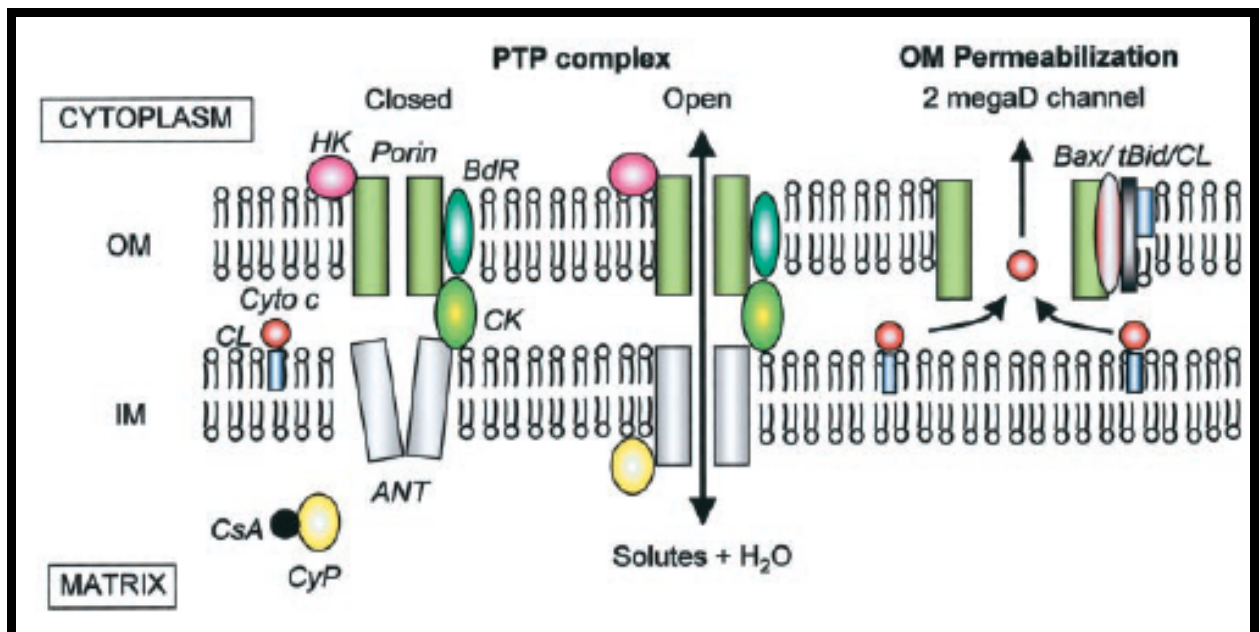


Fig.8: protéines impliquées dans la formation et/ou le contrôle PTP (membrane interne) et la perméabilisation de la membrane externe au cytochrome c et les molécules de PM élevé. BdR (récepteur des benzodiazepine), CL (cardilipides), CK (creatine kinase), Cyto c (cytochrome c), CyP (cyclophiline D), HK (hexokinase) et porine, VDAC [Weiss et al., 2003].

2.1.3. Nature du pore de transition de perméabilité (PTP)

Le PTP est un assemblage de protéines préexistantes localisées dans la membrane mitochondriale interne et externe en un grand canal de haute conductance perméable à des solutés de masse moléculaire inférieure ou égal à 1.5 kDa [Brookes et al., 2004 ; Bernardi et al., 2006].

La nature moléculaire exacte du PTP est à ce jour inconnu et reste à déterminer [Brookes et al., 2004 ; Argaud et al., 2006]. Il se composerait d'un complexe polyprotéique avec des composants localisés dans les 2 membranes mitochondriales (externe/interne), dans l'espace intermembranaire et dans la matrice mitochondriale (Figure 9).

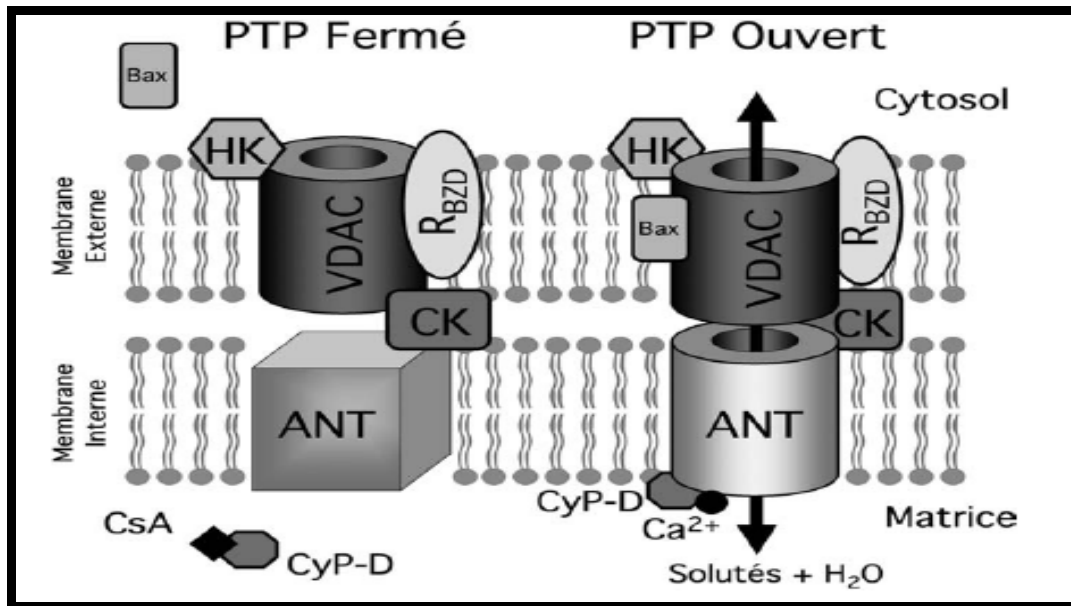


Fig.9: Modèle structural du pore de transition de perméabilité. Le pore de transition de perméabilité (PTP) dont la structure exacte est inconnue est un assemblage multiprotéique connu sous deux configurations : l'une fermée ou la membrane mitochondriale interne est imperméable, l'autre ouverte induite par le Ca^{2+} faisant communiquer librement la matrice et le cytosol. Pour un certain nombre de protéines, parmi les nombreuses suspectées d'être impliquées dans la structure du PTP, le niveau de preuve de leur implication est plus important. C'est le cas pour une protéine de la matrice, la cyclophiline D (CyP-D), une protéine de la membrane interne, le transporteur des nucléotides adényliques (ANT), des protéines de la membrane externe, la porine (VDAC), la créatine kinase (CK), l'hexokinase (HK), le récepteur aux benzodiazépines (RBZD), et les protéines cytosoliques de la famille Bcl-2, telles que Bax, capables de se transloquer dans la membrane mitochondriale afin de perméabiliser la membrane interne [Argaud et al., 2006].

Le regroupement de différents travaux permet d'établir une configuration minimale au PTP qui regrouperait : la translocase des nucléotides adényliques (ANT, membrane interne), le canal anionique voltage-dépendant ou porine (VDAC, membrane externe), et la cyclophiline D (Cyp-D, matrice), le complexe I (membrane interne), la créatine kinase (membrane interne), l'hexokinase (membrane externe), le récepteur des benzodiazépines (RBZD), ainsi que des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bax, capables de se transloquer dans la membrane mitochondriale afin de perméabiliser la membrane interne [Brookes et al., 2004 ; Basso et al., 2005; Bernardi et al., 2006].

Le PTP existerait donc dans la mitochondrie sous deux configurations : l'une fermée et l'autre ouverte faisant largement communiquer la matrice avec le cytosol (Figure 9).

2.2. Voie apoptotique extrinsèque

L'activation des voies apoptotiques extrinsèques nécessite l'intervention des récepteurs de mort ou DR (Death Receptor) de la superfamille du récepteur du $\text{TNF-}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor). La famille des TNF-R est une famille de plus de 20 membres parmi lesquels les récepteurs de mort (DR1 à DR5) partagent des séquences d'homologie dans leur domaine intracytoplasmique responsables de

la signalisation apoptotique. Parmi les récepteurs de mort, Fas (DR2) et TNF-R1 (DR1) sont les récepteurs qui ont été les plus étudiés. Les récepteurs Fas (DR2) sont exprimés par la majorité des types cellulaires. Après fixation à leur ligand, ces récepteurs déclenchent une succession d'événements moléculaires qui conduisent à l'oligomérisation des récepteurs transmembranaires, suivie du recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques qui à leur tour vont recruter les procaspases initiatrices 8 et 10 [Marchetti, 2005].

3. Anthracyclines et mort cellulaire

La production de ROS et la déglycosidation de la doxorubicine lui permettent d'induire les deux premières étapes de l'apoptose médiée par la mitochondrie au niveau des cardiomyocytes : le priming ou amorçage (induit par H_2O_2 et consistant à des changements progressifs de la membrane mitochondriale interne) et la dépolarisation. Priming et dépolarisation seraient suivis alors par le gonflement, la fragmentation et la libération du cytochrome c [Minotti et al., 2004].

Au cours du cycle rédox de la doxorubicine dans les cellules cardiaques, il y a formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et de H_2O_2 qui induisent la synthèse de la protéine p53 qui active la transcription des gènes codant pour les protéines pro-apoptotiques tel que Bax d'où l'ouverture du PTP [Miyashita et Reed, 1998] ou en diminuant l'expression de la protéine Bcl-XL (membre de la famille de protéine Bcl-2 qui bloque la libération du cytochrome c) [Minotti et al., 2004].

Cependant, l'ouverture du PTP peut aussi être induite directement par l'anion superoxyde et H_2O_2 formés au cours du cycle rédox de la doxorubicine [Green et Leeuwenburgh, 2002].

D'autre part, durant le cycle rédox de la doxorubicine, la semiquinone formée peut être oxydée par la liaison entre le cycle A du noyau tétracyclique et la daunosamine ayant pour résultat la déglycosidation de la doxorubicine et formation d'un aglycone, le 7-deoxyaglycone. En raison de leur lipophilie élevée, les aglycones s'intercalent dans les membranes biologiques entre autre la membrane mitochondriale interne et augmentent la fuite d'électrons des complexes de la chaîne respiratoire vers l'oxygène moléculaire conduisant à la formation de plus en plus élevée de $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 et par conséquent l'amplification du dysfonctionnement mitochondrial; les aglycones sont considérablement plus puissants que la doxorubicine pour induire la perméabilité de la membrane mitochondriale interne [Minotti et al., 2004].

CHAPITRE 3
LES ACTEURS DU
STATUT OXYDANT
CELLULAIRE

Les acteurs du statut oxydant cellulaire

L'équilibre «redox» intracellulaire ou potentiel redox est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule. Cette notion s'apparente à la notion de pH intracellulaire associée aux couples acido-basiques.

Il existe donc au sein de la cellule des espèces moléculaires oxydantes qui pour gagner un électron attaquent les molécules cellulaires (réaction d'oxydation). L'oxygène, les espèces oxydantes issues de l'oxygène (ROS) et les espèces radicalaires (qui peuvent aussi être des ROS) sont fortement susceptibles d'attaquer les molécules cellulaires, et si leur production est trop importante, les effets sont délétères pour les cellules. Des molécules anti-oxydantes (glutathion, vitamine E...) peuvent jouer le rôle de tampon redox (à l'instar d'un tampon acido-basique) en réduisant ces ROS ou les espèces radicalaires. De plus les cellules sont dotées de défenses enzymatiques anti-oxydantes capables de lutter contre ces ROS. C'est la balance entre la production de ROS et les défenses antioxydantes qui définit le statut oxydant cellulaire. En cas de déséquilibre, lors d'une surproduction de ROS ou d'une défaillance des défenses anti-oxydantes, la cellule se trouve alors dans un état de stress oxydant.

1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces radicalaires

1.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique, neutre ou chargée, caractérisée par un électron libre dit «célibataire» sur son orbitale externe. L'électron célibataire est conventionnellement représenté par un point «•». La formation d'un radical libre peut résulter de la rupture homolytique d'une liaison covalente (par opposition à la rupture hétérolytique donnant naissance à des ions de charge opposée) ou d'un transfert d'électron (Figure 10).

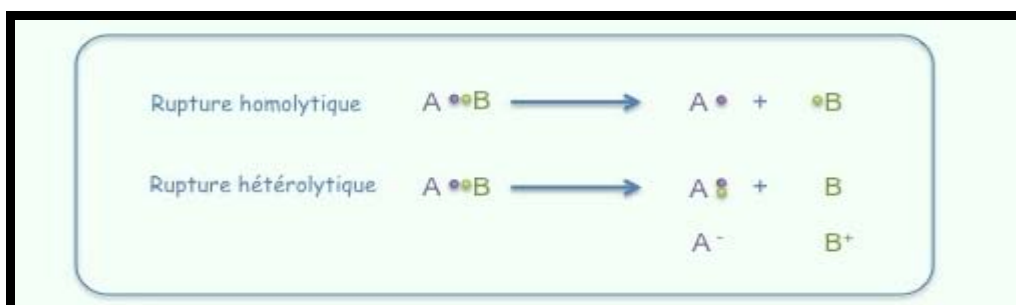


Fig.10 : Production d'espèces ioniques et radicalaires.

Les radicaux libres sont le plus souvent des espèces chimiques très réactives ayant une durée de vie extrêmement courte (10^{-9} pour HO•, 10^{-6} pour RO•, 10^{-1} pour ROO• et de 1 à 10 secondes pour le

NO^{*}), car elles cherchent à «réapparier» leur électron célibataire avec les molécules de leur environnement [Vergely et Rochette, 2003 ; Pacher et al., 2007].

1.2. Sources biologiques de radicaux libres

Contrairement à l'idée répandue par les premières études portant sur la toxicité des radicaux libres, la production d'espèces radicalaires est un phénomène permanent au sein des organismes vivants. L'essentiel de cette production physiologique (pouvant devenir pathologique) est associé au métabolisme cellulaire de l'oxygène et aux réactions d'oxydo-réduction [Cadenas et Davies, 2000 ; Halliwell et Gutteridge, 2007; Mracek et al., 2009].

1.2.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire, dans laquelle de nombreuses réactions de transfert d'électrons se produisent, est reconnue comme une source intracellulaire importante de ROS [Kowaltowski et al., 2009]. On estime qu'environ 2 % à 5 % de l'oxygène utilisé par la chaîne respiratoire mitochondriale fait l'objet d'une réduction monovalente, qui s'accompagne d'une production d'anion superoxyde O₂^{•-}, ce qui représente environ 250 g/j chez l'homme [Vergely et Rochette, 2003].

D'autre part, le taux physiologique de la production mitochondriale de O₂^{•-} et de H₂O₂ associé à la chaîne respiratoire dépend de l'état du métabolisme mitochondrial:

- ❖ Etat 3 : caractérisé par une consommation d'oxygène élevée ainsi qu'une disponibilité ample d'ADP, cet état est associé à une production très faible de O₂^{•-} et de H₂O₂ étant donné l'état hautement oxydé des composants de la chaîne respiratoire.
- ❖ Etat 4 : caractérisé par un taux relativement lent de respiration (pas de consommation d'oxygène, et aucune disponibilité d'ADP), cet état est associé à une production relativement élevée de O₂^{•-} et de H₂O₂, probablement ceci est dû à l'état hautement réduit des transporteurs.
- ❖ Etat 5 : limitation des réserves en O₂ (anoxie), aucune réduction même partielle de O₂ en O₂^{•-} ou H₂O₂ ne se produit [Cadenas et Davies, 2000; Staniek et Nohl, 2000].

En fin, trois autres facteurs limitent une production importante de ROS par la mitochondrie et la maintiennent dans les limites physiologiques:

- ❖ la faible concentration de l'oxygène à l'intérieur de la mitochondrie.
- ❖ l'organisation des transporteurs d'électrons en complexes.
- ❖ la présence de protéines découplantes.

ainsi toute perturbation de la structure hautement organisée de la mitochondrie entraîne une fuite d'électrons et l'augmentation de la formation de ROS [Halliwell Gutteridge, 2007].

1.2.2. Autres sources

1.2.2.1. Les enzymes leucocytaires

Certaines cellules comme les polynucléaires représentent une source importante de ROS car elles sont très riches en oxydases. À l'état basal, cette activité enzymatique est latente et ces cellules ne consomment que très peu d'oxygène. Par contre, elle peut être rapidement activée par divers stimuli inflammatoires, ce qui implique une accélération de la consommation d'oxygène, désignée sous le terme de « oxygen burst », concomitante à la production de ROS. Les stimuli biologiques qui activent cette explosion oxydative sont multiples : il peut s'agir d'un complexe immun, d'une particule opsonisée, de fractions activées du complément, de lectines ou de produits du métabolisme de l'acide arachidonique. L'enzyme majoritairement impliquée dans ce phénomène est la NAD(P)H oxydase, présente au niveau des phagosomes et des membranes des polynucléaires, dont l'activation entraîne la production d'anion superoxyde à partir d'oxygène [Vergely et Rochette, 2003].

1.2.2.2. Les NAD(P)H oxydases non leucocytaires

Il est désormais établi qu'une autre isoforme de cette enzyme NAD(P)H oxydase est présente au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, où elle constituerait une source non négligeable d'anion superoxyde. Au niveau cardio-vasculaire, ces enzymes pourraient participer à la régulation de la vasomotricité dépendante de l'endothélium, par l'intermédiaire de leur réaction avec le NO produit à proximité. Par ailleurs, leur rôle est évoqué dans le cadre de certaines pathologies comme l'hypertension artérielle, l'athérosclérose ou l'ischémie-reperfusion [Vergely et Rochette, 2003].

1.2.2.3. Les xanthine oxydases/xanthine déshydrogénases

La xanthine déshydrogénase (XD) est une enzyme dont la fonction principale est l'oxydation des bases puriques, hypoxanthine et xanthine, issues de la dégradation des acides nucléiques, adénosine triphosphate (ATP) et guanosine triphosphate (GTP). Le produit d'oxydation final chez l'homme est l'acide urique.

La XD est présente sous deux formes : la forme déshydrogénase (XD) qui utilise le NAD⁺ comme accepteur d'électron, et la forme oxydase (XO), qui utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons. *In vivo*, dans des conditions physiologiques, la forme XD est prédominante et représente 90% de l'activité XO/XD. Cependant, dans certaines situations pathologiques comme l'ischémie-reperfusion, la forme XD est convertie en XO dont la proportion augmente de 2 à 10 fois, et qui réduit l'oxygène moléculaire en anion superoxyde, impliquant la formation de peroxyde d'hydrogène et d'autres réactions radicalaires [Murray et al., 2002].

1.2.2.4. Les NO synthases

Comme nous l'avons précédemment évoqué, le NO[•] est synthétisé à partir de l'un des atomes d'azote terminaux du groupement guanidine de la L-arginine par une voie enzymatique faisant intervenir les NO synthases (NOS), en présence d'oxygène et de cofacteurs. À ce jour, 4 isoformes de NOS ont été identifiées :

- ❖ Les formes constitutives (cNOS) calcium-dépendantes sont responsables de la synthèse de petites quantités de NO, et sont retrouvées au niveau endothélial (eNOS), neuronal (nNOS) et mitochondrial (mNOS).
- ❖ La forme inducible (iNOS), indépendante du calcium, est présente au niveau de nombreux types cellulaires et a été identifiée, entre autres, au niveau des macrophages et des cellules vasculaires [Vergely et Rochette, 2003].

1.3. Radicaux libres rencontrés en biologie

1.3.1. Anion superoxyde

Un des sites de production du plus simple et la plus courant des radicaux oxygénés libres, l'anion superoxyde, est la mitochondrie dans l'organisme au repos.

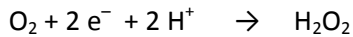
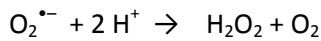
La fuite des électrons intervient en fin du déroulement des processus bien connus du métabolisme énergétique (Figure 11). Le transfert des électrons entre les complexes I (NADH FMN déshydrogénase, ND) et II (succinate déshydrogénase, SD), d'une part, et les complexes III et IV (cytochromes a, b et c) d'autre part, fait appel au coenzyme Q mitochondrial (ubiquinone, UQ), réduit en ubiquinol (UQH₂) au niveau des complexes I et II et oxydé sous sa forme radicalaire ubisemiquinone, UQH[•], puis sous forme ubiquinone lors du transfert des électrons au complexe III. Lors de ce cycle, une partie des électrons s'échappe à partir de la forme intermédiaire radicalaire, UQH[•], du coenzyme Q, pour réagir directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et former les anions superoxydes radicalaires, O₂^{•-} [Arousseau, 2002].

Ce phénomène de fuite des électrons intervient parce que les deux enzymes qui assurent l'approvisionnement de la chaîne respiratoire en énergie (électrons et protons), ND et SD, présentent un potentiel d'activité conjoint supérieur à celui de réutilisation des électrons : la cytochrome oxydase (complexe IV) [Arousseau, 2002], malgré que ce complexe forme des intermédiaires réactifs, mais ne semble pas générer une quantité importante de ROS [Kowaltowski et al., 2009].

La production d'anion superoxyde a lieu essentiellement au niveau des complexes I (15%) et III (85%) [Nivière et Fontecave, 1995 ; Halliwell Gutteridge, 2007; Mracek et al., 2009] et parfois à partir du complexe II et du coenzyme Q [Turrens, 2003 ; Halliwell Gutteridge, 2007].

1.3.2. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), que l'on retrouve dans « l'eau oxygénée », est produit par la dismutation spontanée ou induite (enzymatique) de l'anion superoxyde [Liu et al., 2002 ; Brookes et al., 2004] ou par la réduction bivalente de l'oxygène par les oxydases (xanthine oxydase, glutathion oxydase, la monoamine oxydase...etc) [Nivière et Fontecave, 1995] :



Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre à proprement parler puisqu'il ne possède pas d'électron célibataire. Cependant, il est considéré à juste titre comme un dérivé activé de l'oxygène, de par sa position essentielle au sein des réactions radicalaires.

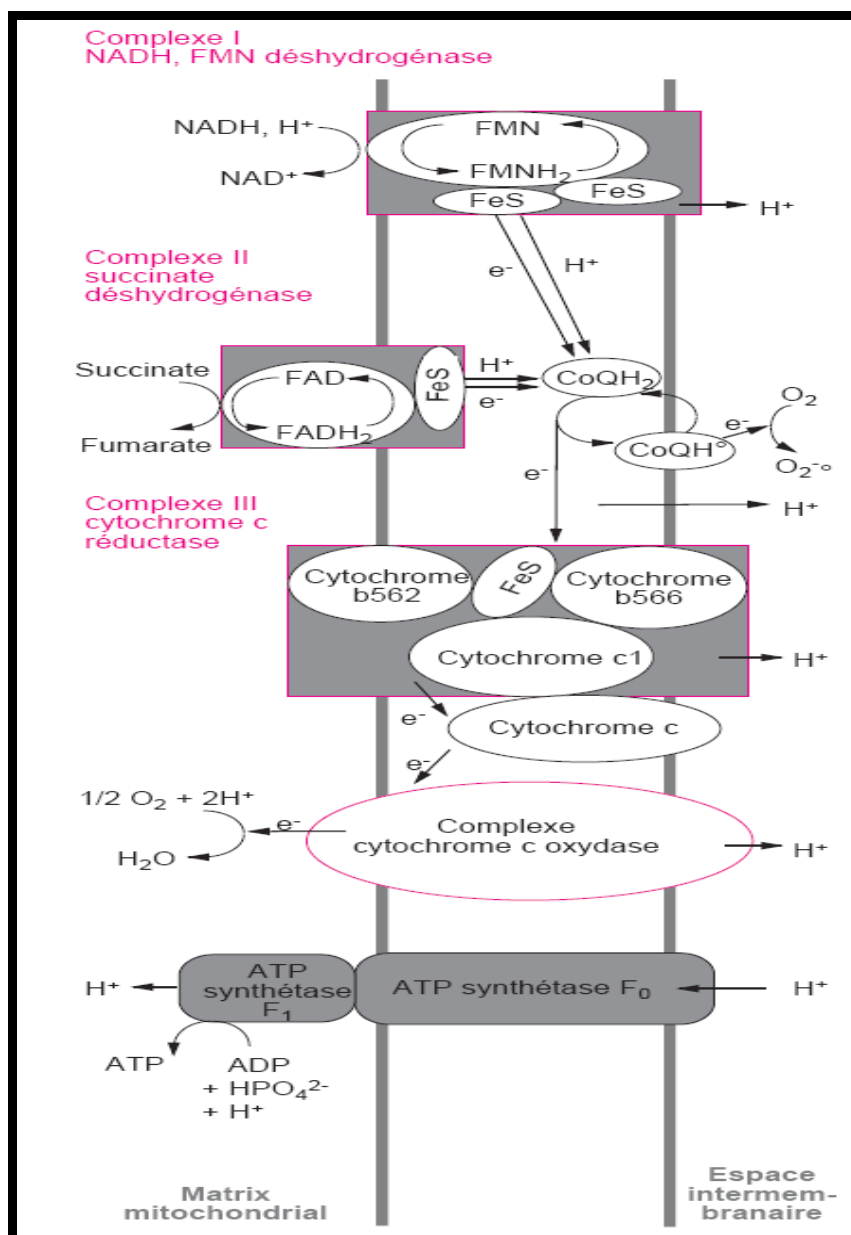


Fig.11: Formation de radicaux superoxydes en parallèle au métabolisme énergétique, par fuite d'électrons à partir de l'ubisemiquinone [Aurousseau, 2003].

Par ailleurs le peroxyde d'hydrogène a la propriété de traverser les membranes biologiques, propriété que ne possède pas l'anion superoxyde. Le peroxyde d'hydrogène possède un fort pouvoir oxydant, participant indirectement à la toxicité de l'oxygène. Ainsi, en présence de métaux de transition, il est capable de générer le très réactif radical hydroxyle (réaction de Fenton) [Babior, 2000].

Pour le peroxyde d'hydrogène mitochondrial, qui correspond à environ 1 % de l'oxygène mitochondrial réduit, il dérive de la dismutation de l'anion superoxyde [Nivière et Fontecave, 1995].

1.3.3. Formation du radical hydroxyle (HO^{\bullet})

Le radical hydroxyle est produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence de catalyseurs minéraux (fer ou cuivre). Au cours de ce mécanisme de formation du radical hydroxyle, le fer peut être soit sous forme ferrique (Fe^{+3}) pour être réduit par l'anion superoxyde (réaction de Haber-Weiss), soit sous forme ferreux (Fe^{+2}) pour transférer les électrons au peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton) [Nivière et Fontecave, 1995 ; Arousseau, 2002 ; Vergely et Rochette, 2003].

Le radical hydroxyle possède une très grande réactivité dans les milieux biologiques, pouvant se « combiner » avec presque tous les composants cellulaires, par échange d'électron, addition sur des doubles liaisons ou arrachement d'un atome d'hydrogène. Le radical hydroxyle est donc un oxydant extrêmement puissant, constituant certainement le radical libre le plus toxique en biologie. Il est notamment à l'origine de la production des radicaux libres dit « secondaires », suite à sa réaction avec différents composés cellulaires [Arousseau, 2002 ; Vergely et Rochette, 2003].

1.3.4. Autres formes radicalaires

D'autres formes radicalaires dites « secondaires » peuvent être retrouvées dans les milieux biologiques. Il s'agit en particulier des radicaux alkyle (R^{\bullet}), alkoxyde (RO^{\bullet}) et alkyl peroxyde (ROO^{\bullet}), générés à la suite de l'action oxydante de radicaux libres oxygénés « primaires » (superoxyde, hydroxyle) sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés, les glucides, les protéines ou les acides nucléiques. Ces radicaux « secondaires » sont moins réactifs mais plus sélectifs que les radicaux primaires. Ils sont à l'origine de processus de réactions radicalaires en chaîne, et en particulier des réactions participant à la lipoperoxydation des membranes cellulaires [Vergely et Rochette, 2003].

2. Potentialité toxique des espèces radicalaires

Il est nécessaire de rappeler que, dans des conditions physiologiques, les ROS jouent un rôle majeur au sein de l'organisme, en intervenant notamment dans la modulation de l'activité de certains facteurs de transcription ou dans les processus de phagocytose [Favier, 2003]. Cependant,

lorsque les systèmes de défenses anti-radicalaires sont dépassés, un stress oxydatif s'établit aux dépens de l'intégrité cellulaire (Figure 12) [Vergely et Rochette].

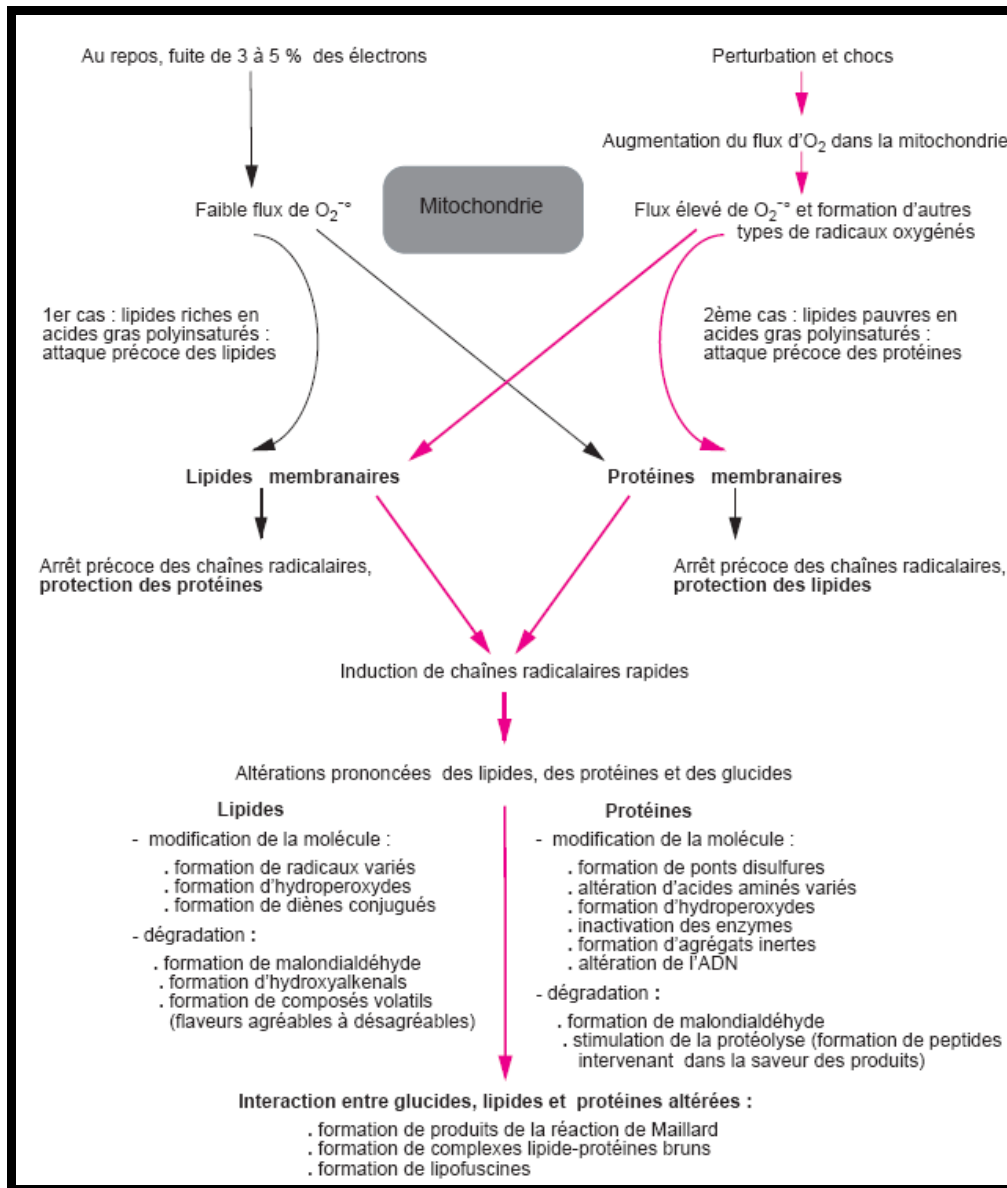


Fig. 12: Altération des constituants membranaires par les radicaux libres [Arousseau, 2002].

2.1. Acides gras

Les acides gras insaturés, constituants essentiels des membranes cellulaires (30 à 50%), constituent une cible majeure pour les ROS. L'attaque radicalaire des membranes cellulaires phospholipidiques déclenche une réaction en chaîne appelée lipoperoxydation membranaire qui va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...). L'oxydation des cardiolipines de la mitochondrie est un facteur déterminant dans le déclenchement de l'apoptose des cellules [Cillard et Cillard, 2006].

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne qui se déroule en trois étapes (Figure 13):

Initiation : c'est l'abstraction d'un atome d'hydrogène (H^\bullet) de l'acide gras situé sur un carbone placé entre deux doubles liaisons (liaison hydrogène-carbone plus faible), ce qui conduit à la formation d'un radical alkyle (R^\bullet) [Cillard et Cillard, 2006 ; Guichardant et al., 2006].

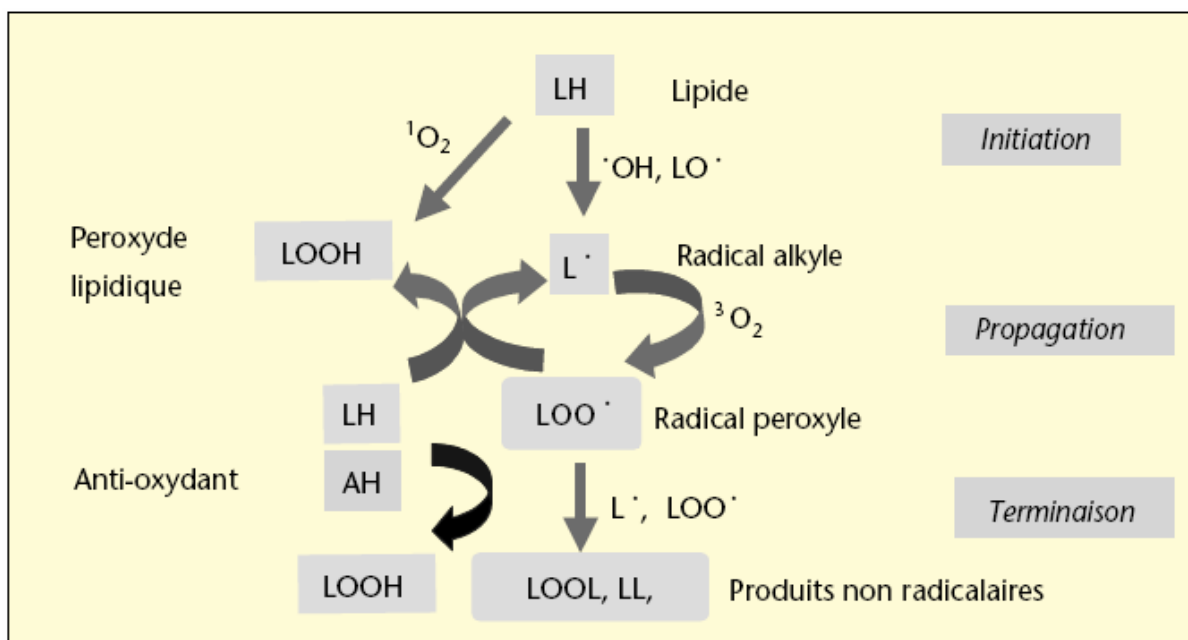


Fig.13: Mécanisme de l'auto-oxydation des acides gras par l'oxygène triplet et l'oxygène singulet. [Cillard et Cillard, 2006].

La propagation et l'amplification se traduit par la réaction du radical libre R^\bullet avec une molécule d'oxygène triplet (3O_2) pour former un radical peroxyde ROO^\bullet . Ce dernier est capable d'arracher un atome d'hydrogène à un autre acide gras RH , devenant ainsi un peroxyde $ROOH$ tout en libérant un nouveau radical d'acide gras R^\bullet capable d'induire à son tour la même cascade réactionnelle [Guichardant et al., 2006].

La terminaison : après avoir atteint une vitesse maximale d'oxydation, celle-ci diminue par combinaison des radicaux lipidiques pour donner des produits non radicalaires. La réaction la plus fréquente est une réaction de dimérisation qui est liée à la pression partielle d'oxygène du milieu. À pression d'oxygène élevée se sont surtout les radicaux peroxydes qui réagissent entre eux : $LOO^\bullet + LOO^\bullet \rightarrow LOOL + ^1O_2$

[Aurousseau, 2002 ; Cillard et Cillard, 2006].

2.2. Acides nucléiques

Les acides nucléiques sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux libres. Les agressions radicalaires créées au sein de la molécule d'ADN peuvent entraîner des ruptures de brins

et des mutations ponctuelles, qui peuvent avoir de graves conséquences sur la synthèse des protéines et sur la transmission de l'intégrité du patrimoine génétique [Vergely et Rochette, 2003].

2.3. Protéines

L'électron non apparié des radicaux libres peut s'attaquer à la structure de certaines protéines, en particulier les protéines porteuses d'un groupement sulfhydryle (-SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et pour lesquelles on observe la formation de ponts entre protéines, une fragmentation ou une dénaturation. Ces réactions peuvent altérer de façon marquée le métabolisme cellulaire en modifiant la conformation et/ou l'activité biologique de ces protéines [Vergely et Rochette, 2003].

CHAPITRE 4
SYSTEMES DE CIBLAGE
ET DE VECTORISATION

Systemes de Ciblage et de Vectorisation

En pharmacologie galénique, les stratégies utilisées pour vectoriser les anthracyclines vers une tumeur afin d'améliorer leur efficacité et/ou diminuée leur cardiotoxicité sont de deux types :

- ❖ le développement de vecteurs favorisant la distribution préférentielle des anthracyclines dans la tumeur tout en respectant les tissus sains;
- ❖ la conjugaison d'anthracyclines à un transporteur qui reconnaît spécifiquement les cellules tumorales.

Les vecteurs corpusculaires (ex. liposomes) et les vecteurs macromoléculaires (prodrugs) offrent les meilleurs exemples pour la première et la deuxième stratégie respectivement. Les immunoliposomes regroupent les deux stratégies [Minotti et al., 2004].

Le terme de vecteur regroupe, selon la définition du **GTRV** (Groupe Thématique de Recherche sur les Vecteurs), «*toutes les structures capables de véhiculer une molécule d'intérêt biologique en modifiant sa distribution tissulaire et/ou cellulaire, ou son interaction avec les cibles, tant in vivo qu'ex vivo* »

1. Définition de la vectorisation

La vectorisation est une opération visant à moduler ou à maîtriser la distribution d'une substance en l'associant à un système approprié appelé vecteur. Son principe consiste à rendre la distribution tissulaire et/ou cellulaire ou ses interactions avec des cellules cibles aussi indépendante que possible des propriétés physico-chimiques de la substance elle-même et à la soumettre à celle d'un vecteur approprié, choisi en fonction de l'objectif envisagé [Puisieux et Roblot-Treupel, 1989].

2. Les liposomes

Les liposomes font partie des systèmes supramoléculaires organisés de molécules tensioactives [Plats et al., 2005]. Ce sont des microvésicules constituées d'une ou plusieurs bicouches concentriques (Figure 14) de nature phospholipidique et de cholestérol entourant un ou plusieurs espaces internes aqueux. Les principes actifs hydrophiles sont encapsulés dans les cavités aqueuses, les molécules lipophiles dans les bicouches [Torchilin, 2006 ; Santra et Mukherjee, 2009].

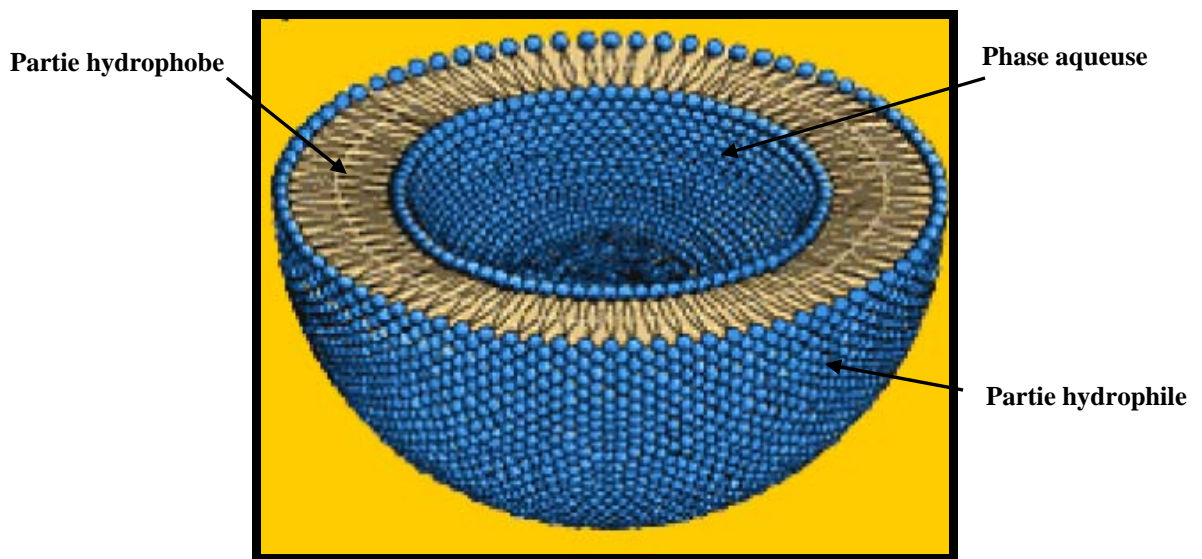


Fig.14: Représentation schématique d'un liposomes [Santra et Mukherjee, 2009].

2.1. Principaux vecteurs liposomaux

Les vecteurs, forme pharmaceutique particulière orientant un principe actif à un niveau donné dans l'organisme, se déclinent en génération en fonction de l'évolution des progrès (figure 15) :

2.1.1. Vecteurs ou liposomes de première génération

Les liposomes de première génération peuvent être définis comme des liposomes composés seulement de phospholipides (neutres et/ou négativement chargés) et/ou de cholestérol. Il s'agit d'une structure vésiculaire constituée d'une ou plusieurs bicouche lipidique et renfermant un compartiment aqueux.

L'inconvénient majeur de ces vecteurs de première génération provient de leur courte durée de vie dans la circulation sanguine. Ceci est dû à leur accumulation principalement hépatique et splénique secondaire au phénomène d'opsonisation. Les liposomes de première génération ont été utilisés pour le traitement des affections hépatique et splénique; le Myocet est une forme liposomale (1^{ère} génération) de doxorubicine [Storm et Crommelin, 1998 ; Santra et Mukherjee, 2009].

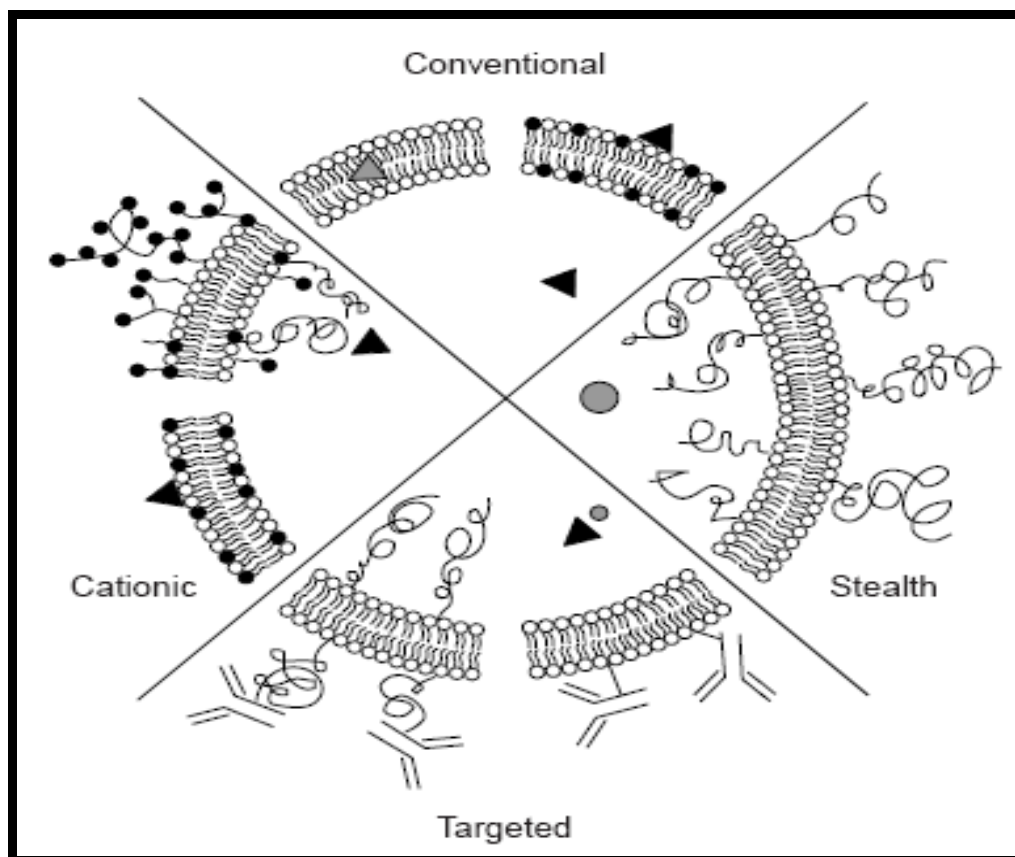


Fig.15: Représentation schématique des quatre types de vecteurs liposomaux. Liposomes conventionnels (1ère génération) ; liposomes pégylés ou stealth (2ème génération). Immunoliposomes (3ème génération) avec un système de ciblage [Storm et Crommelin, 1998].

2.1.2. Vecteurs ou liposomes de deuxième génération

Pour contourner le problème d'élimination rapide des liposomes conventionnels de la circulation sanguine par les macrophages du foie et de la rate, les vecteurs ont été recouverts d'une couche de polymères hydrophiles (e.g. polyéthylène glycol (PEG), polysaccharides) les protégeant d'une détection et d'une opsonisation (répulsion stérique) par le système phagocytaire mononucléaire (système réticuloendothélial) ce qui augmente leur demi-vie plasmatique : le Caelyx ou Doxil est une forme liposomale de doxorubicine recouvert d'une surface pégylée (PEG).

Les liposomes pégylés sont appelés aussi liposomes furtifs « *Stealth liposomes* » pour leur aptitude à échapper au système immunitaire, ou liposomes stériquement stables « *Sterically stabilized liposomes* » en référence à leur longue demi-vie.

La stabilisation stérique provient de la présence à la surface des liposomes de groupements PEG hautement hydratés qui créent une barrière stérique empêchant les interactions hydrophobes et électrostatiques entre les liposomes et les composantes moléculaires et cellulaires dans les liquides biologiques [Storm et Crommelin, 1998 ; Santra et Mukherjee, 2009; Chuto et al., 2010].

2.1.3. Vecteurs ou liposomes de troisième génération

Afin de favoriser l'accumulation des liposomes dans un tissu donné, il est indispensable de fonctionnaliser leur surface avec des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules composant le tissu d'intérêt. Les ligands peuvent être des anticorps, des peptides, des saccharides, des oligonucléotides ou d'autres molécules comme le folate. Ainsi, ils correspondent à des vecteurs de deuxième génération (présence d'une barrière stérique) auxquels ont été fixé un élément de reconnaissance particulier pour la cible visée par un bras espaceur [Torchilin, 2006].

2.2. Avantages des vecteurs liposomaux

Comparé aux microsphères ou aux nanoparticules, les liposomes sont de loin les vecteurs les plus utilisés pour encapsuler les anthracyclines en chimiothérapie pour les raisons suivantes [Minotti et al., 2004 ; Plats et al., 2005]:

- ❖ Un volume de distribution et une clearance réduits ainsi qu'une demi-vie prolongée ;
- ❖ Conversion ou métabolisation limitée en aglycones ou en alcools secondaires ;
- ❖ accumulation préférentielle dans les zones caractérisées par des vaisseaux sanguins à endothélium fenestré ou discontinu (tumeur) et dans les macrophages du système réticuloendothélial (foie et rate);
- ❖ la libération prolongée (retardée) du médicament dans l'environnement de tumeur;
- ❖ contournement partiel du système Pgp responsable de la résistance;
- ❖ accumulation limitée dans les tissus sains ayant une barrière endothéliale normale ;

2.3. Classification des liposomes

La classification des liposomes est basée sur le nombre de leurs compartiments, leur taille et leur mode d'obtention. En se fondant sur ces critères, trois types de liposomes ou de vésicules ont été distingués (Figure 16) :

2.3.1. Les vésicules multilamellaires (multilamellar vesicles : MLV)

Il s'agit de liposomes présentant plusieurs compartiments aqueux concentriques et dont le diamètre varie de 0.1 μ m à 2 μ m. La structure observée ressemble à une coupe transversale d'un oignon étant donné qu'ils sont constitués de plusieurs couches membranaires superposées concentriques [Dousset et Douste-Blazy, 1985 ; Machy et Leserman, 1987 ; Plats et al., 2005].

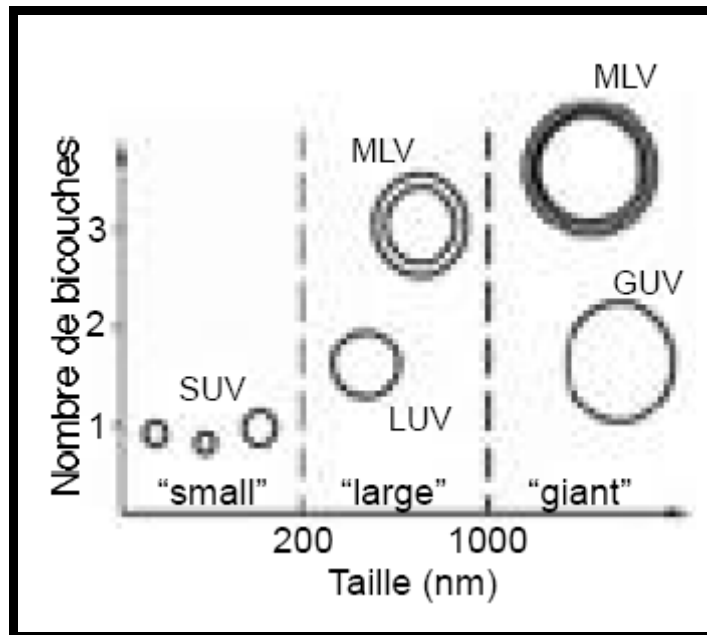


Fig.16: Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille [Lorin et al., 2004].

2.3.2. Les petites vésicules unilamellaires (small unilamellar vesicles : SUV)

Comportent une seule paroi et une seule cavité aqueuse. Leur diamètre est de l'ordre de 15nm-25nm. Ce sont les plus petites structures vésiculaires qui peuvent être obtenues [Dousset et Douste-Blazy, 1985 ; Machy et Leserman, 1987 ; Plats et al., 2005].

2.3.3. Les grandes vésicules unilamellaires (large unilamellar vesicles : LUV)

Ce sont des vésicules de dimension similaires à celles des MLV mais entourées d'une seule bicouche lipidique à 1 μm [Dousset et Douste-Blazy, 1985 ; Machy et Leserman, 1987 ; Plats et al., 2005].

3. Potentialités thérapeutiques des liposomes

3.1. Définition du phénomène EPR

Le phénomène EPR en anglais (pour « Enhanced Permeation and Retention ») : correspond à un accroissement de la perméation engendré par les fenestrations de l'endothélium vasculaire, ainsi qu'à une augmentation de la rétention à cause du faible drainage lymphatique. Cet effet EPR favorise notamment l'accumulation de macromolécules, de liposomes et de nanoparticules au sein des tumeurs solides. C'est pourquoi l'inclusion de substance de chimiothérapie dans des liposomes permet un ciblage passif et sélectif des cellules tumorales (figure 17) [Lyer et al., 2006 ; Chuto et al., 2010].

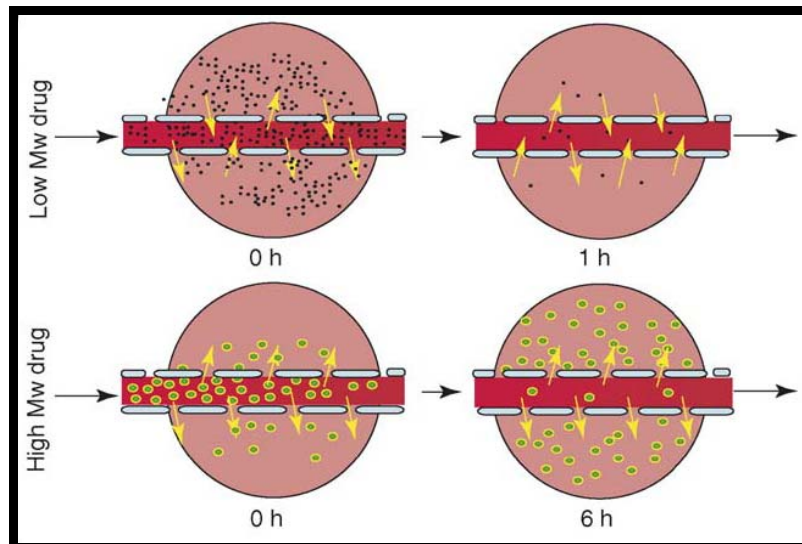


Fig.17: Principe de l'effet EPR. Les composés de faible PM (spots noirs) peuvent diffuser librement dans de part et d'autre du vaisseau sanguin à cause de leur bas PM et leur concentration dans la tumeur diminue après 1h quand la concentration plasmatique chute. Alors que pour les composés de haut PM (spots verts), le mauvais retour veineux et faible drainage lymphatique, empêche leur diffusion en sens inverse ce qui entraîne leur accumulation progressive dans le tissu tumoral avec le temps : effet EPR [Lyer et al., 2006].

3.2. Bases physiopathologiques de l'effet EPR

Comme tout tissu sain, la tumeur nécessite de l'oxygène et des nutriments pour sa croissance. Ainsi, la tumeur induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux de tissus sains avoisinant, c'est l'angiogénèse qui se développe lorsque la tumeur atteint un diamètre de 2-3 mm. Cette néovascularisation diffère beaucoup de celle des tissus sains du point de vue anatomique.

Les vaisseaux sanguins dans la tumeur ont une forme irrégulière, dilatée, défectueuse et les cellules endothéliales sont mal alignées, désorganisées et séparées par de grandes espaces ou fenestrations (600 à 800nm). De plus, les cellules perivasculaires (muscle lisse) et la membrane basale sont fréquemment absentes ou anormales ce qui entraîne une dilatation des vaisseaux. En outre, le tissu tumoral est caractérisé par un drainage lymphatique et un retour veineux faibles. En effet, la rapide croissance tumorale induit une forte densité, ce qui réduit l'espace intercellulaire et limite le drainage par la lymphe (Figure 18).

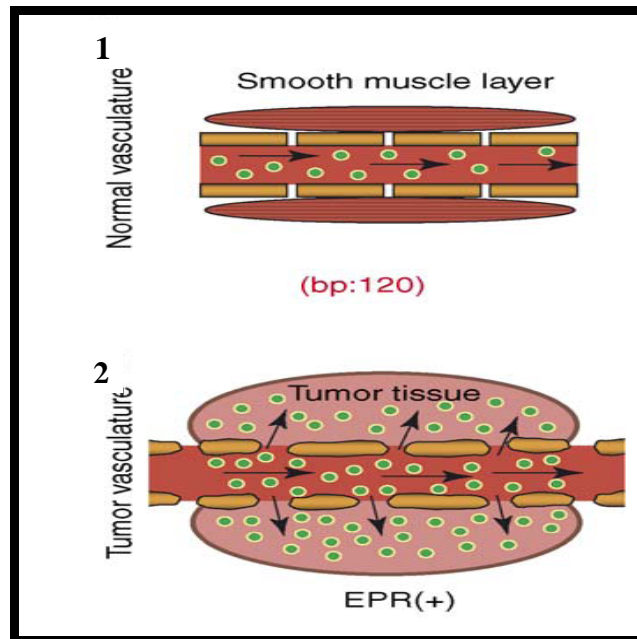


Fig.18: Représentation schématique du Ciblage passif et sélectif ou effet EPR. Le faible diamètre des liposomes, environ 100 nm, et leur persistance dans la circulation sanguine favorisent leur extravasation à travers les vaisseaux anormalement perméables des tissus tumoraux. Ceci leur permet de s'accumuler dans l'espace interstitiel où les liposomes déversent progressivement la doxorubicine sur les cellules tumorales environnantes (2) alors que dans les vaisseaux normaux, les liposomes restent dans le lit vasculaire (1) [Lyer et al., 2006].

Ces anomalies anatomiques des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur, entraînent une fuite accrue (enhanced permeability) des composants plasmatiques du lit vasculaire vers l'espace interstitiel de la tumeur. Le mauvais retour veineux et le faible drainage lymphatique entraînent une rétention (retention) des composants plasmatiques dans la tumeur : c'est le phénomène EPR (Figure 18) qui permet de concentrer les agents anticancéreux au sein de la tumeur 10 à 50 fois plus que dans le tissu normal au cours de 1 à 2 jours [Robert, 2005 ; Lyer et al 2006; Wang et al., 2008].

3.3. Libération de la doxorubicine encapsulée

Les mécanismes favorisant la libération de la doxorubicine à partir du liposome dans la tumeur sont encore moins clairs. Le microenvironnement de la tumeur (pH acide, présence de lipases libérées par les cellules tumorales mortes et d'agents oxydants par les cellules inflammatoires infiltrant la tumeur) contribue à déstabiliser le transporteur lipidique. En outre, les cellules phagocytaires sises dans la tumeur peuvent dégrader les liposomes libérant ainsi la doxorubicine. Le rôle de macrophages associés à la tumeur peut être plus complexe qu'auparavant : par un mécanisme encore mal élucidé, ces macrophages augmentent la perméabilité vasculaire au sein de la tumeur [Minotti et al., 2004].

3.4. Liposomes à vocation thérapeutique

Les premiers transporteurs pharmacologiques nano-particulaires ont été commercialisés dans la dernière décennie du XXème siècle. L'injection à l'homme de liposomes de quelques dizaines de nanomètres de diamètre encapsulant des molécules anticancéreuses est approuvée depuis plus de 10 ans pour le traitement de certains cancers du sein ou de l'ovaire. Ainsi en 1997, le DaunoXome® (NeXstar Pharmaceuticals, Inc.) est arrivé dans l'arsenal de chimiothérapie. Il s'agit de liposomes encapsulant de la daunorubicine. Cette formulation a été suivie en 1999 par l'AmBisome® (Gilead Sciences / Fujisawa Healthcare) qui est également basée sur des liposomes dont la bicouche lipidique comporte des molécules d'Amphotéricine B, un antibiotique antifongique. La doxorubicine, une molécule anticancéreuse, est également commercialisée sous forme liposomale sous les noms de Myocet® (Elan Europe) et Doxil®(USA) / Caelix®(Europe) (Johnson & Johnson Alza). Dans ce dernier cas, la formulation du liposome comporte des agents de furtivité afin d'améliorer sa biodistribution ; de telles particules sont appelées liposomes furtifs [Plats et al., 2005].

CHAPITRE 5
LA PROPOLIS ET SES
POLYPHENOLS

La propolis et ses polyphénols

I. La Propolis

1. historique de la propolis

Les premières traces d'utilisation de la propolis remontent vraisemblablement à l'ère de l'Égypte ancienne, où elle était utilisée par les prêtres pour ses propriétés conservatrices et aromatiques dans le cadre des rites sacrés de la momification et de l'embaumement. La propolis était également connue à l'époque de la Grèce antique. C'est d'ailleurs durant cette période qu'est né le mot propolis [Lotfy, 2006]. **Aristote** (4^{ème} siècle avant Jésus-Christ) en parle dans son «*Historia animalium*» et la considère comme «*remède aux affections de la peau, plaies et suppurations*». **Alexander de Tralles** (médecin grec 6^{ème} siècle) rapporte l'intérêt de la propolis dans les affections de l'estomac et du foie [Ghedira et al., 2009].

Au 11^{ème} siècle, le philosophe et médecin iranien **Avicenne** distingue deux sortes de cire dans la ruche : la cire propre et la cire noire. La cire propre entre dans la composition des alvéoles de miel alors que la cire noire représente la souillure de la ruche; il est évident que c'est la propolis que Avicenne désigne par cire noire. Il note à son propos : «*elle a la qualité de faire éliminer les pointes de flèches et des épines, raréfie, nettoie facilement, amollit fortement et que par sa forte odeur, la cire noire vous fait éternuer* » [Hegazi, 2000].

Au 12^{ème} siècle, on la trouve mentionnée dans les livres de médecine en Géorgie (Russie), où elle entre dans la composition de nombreux remèdes. En France, on commence à en trouver trace de son usage dans le traitement des plaies au 18^{ème} et 19^{ème} siècle. Mais c'est surtout au moment de la guerre des Boers en Afrique du sud, dans les années 1900, qu'elle connaît son apogée d'utilisation du fait de l'excellence de ses résultats en matière de désinfection et de cicatrisation [Hegazi, 2000 ; Lotfy, 2006].

2. Définition

La propolis (du grec pro : devant, à l'entrée et polis : ville), ou colle de l'abeille (bee glue) est un nom générique utilisé pour désigner une substance naturelle, résineuse, gommeuse, balsamique, aromatique de couleur sombre élaborée par des abeilles ouvrières spécialisées (les butineuses) [Gomez-Caravaca et al., 2006 ; Dutau et Rancé, 2009 ; Ghedira et al., 2009].

Le Département Américain d'Agriculture **USDA** en 1985 a défini la propolis comme «*une gomme recueillie par les abeilles à partir de différentes plantes et dont la couleur peut varier du jaune clair au marron foncé. Elle peut être responsable de la coloration de l'alvéole de miel ou du cadre (elle colore la cire d'abeille) et peut être retrouvée dans le miel* » [Burdock, 1998].

3. Composition de la propolis

La composition chimique de la propolis est variable selon l'origine géographique et l'écologie de l'abeille, ainsi que des arbres et des végétaux se trouvant dans son écosystème. Le dernier critère est très important car, à défaut des plantes nécessaires aux abeilles pour élaborer la propolis, ces dernières utilisent des matériaux de substitution plus ou moins nocifs pour la santé humaine (bitume, vernis, huiles minérales, etc.) [Ghedira et al., 2009].

Malgré les différentes sources végétales dont la propolis est issue, les différents échantillons de propolis sont constitués de 50 à 55% de résines et baumes végétales, 25 à 35% de cire (30 % en moyenne), 10% d'huiles volatiles ou essentielles, 5% de pollen et 5% de matières diverses organiques (polyphénols et vitamines) et minérales [Marcucci, 1995 ; Burdock, 1998 ; Dutau, 2004 ; Gomez-Caravaca et al., 2006 ; Dutau et al., 2009 ; Ghedira et al., 2009].

4. Données biologiques

4.1. Mécanisme d'action

La diversité d'éléments actifs et complémentaires que la propolis comporte lui assure des propriétés thérapeutiques hors du commun. Aucun de ces éléments ne semble contribuer à ces effets thérapeutiques plus que les flavonoïdes.

Les effets thérapeutiques des flavonoïdes dans l'organisme relèvent de quatre mécanismes [Havsteen, 2002]:

- ❖ Liaison avec affinité aux les polymères biologiques (enzymes) entraînant leur inactivations;
- ❖ Complexation (chélation) des ions de métaux lourds;
- ❖ Catalyseurs de transporteurs d'électrons dans les réactions d'oxydo-réduction;
- ❖ Piégeurs de radicaux libres;

4.2. Pharmacocinétique

Voir plus bas (les flavonoïdes)

4.3. Toxicité

Les données sur la toxicité aiguë d'extraits bruts de propolis dans la littérature sont peu nombreuses, et lorsqu'elles sont existes on note une grande variabilité dans les résultats ceci est due au fait qu'il n'existe pas jusqu'à ce jour une méthode standardisée pour l'extraction ou la préparation des ces extraits [Burdock, 1998]. Cependant la toxicité des extraits de propolis (extraits éthanoliques) est très faible; exprimée en DL₅₀, cette toxicité est supérieure à 15g/kg pour le rat Wistar [Ghedira et al., 2009]. Burdock (1998) explique la faible ou la non toxicité des différents extraits de la propolis par leur richesse en flavonoïdes, molécules connues pour leurs faibles effets toxiques.

II. Polyphénols et Flavonoïdes

1. Définition

1.1. Les polyphénols

Le terme polyphénol a été introduit en 1980 en remplacement du terme ancien de tanin végétal, et a été défini par comme suit : «Composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines» Il s'ajoute à cette définition le fait qu'ils possèdent un pouvoir antioxydant élevé [Chira et al., 2008].

1.2. Flavonoïdes

Le terme «flavonoïdes» désigne un groupe de plus de 6000 composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des plantes vasculaires où ils sont responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [Di Carlo et al., 1999 ; Havsteen, 2002 ; Ghedira, 2005].

2. Structure et classification

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être répartis en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes [Chira et al., 2008]. Seuls les flavonoïdes seront étudiés.

2.1. Structure

Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement benzo- γ -pyrone (Figure 19) [Hacsteen, 2002 ; Ghedira, 2005].

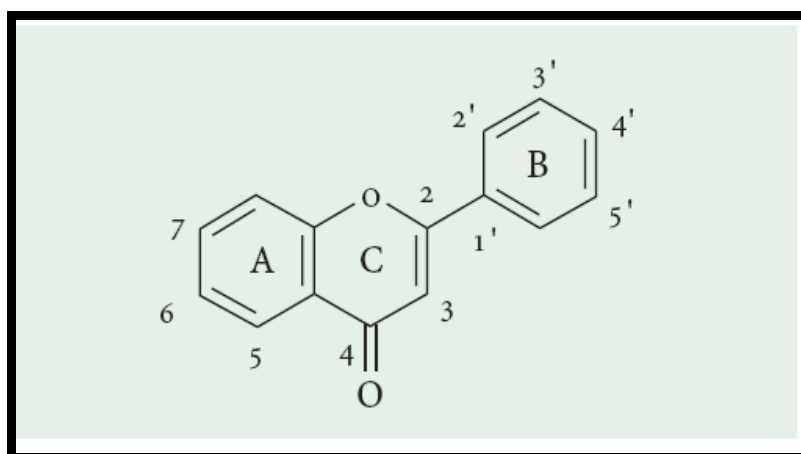


Fig. 19: Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone [Ghedira, 2005].

Ils comprennent 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6, soit deux noyaux aromatiques reliés par un pont de 3 carbones. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques [Chira et al., 2008].

2.2 Classification

Tous les flavonoïdes peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone.

Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes [Di Carlo et al., 1999 ; Ghedira, 2005].

Selon la nature de l'hétérocycle (γ -pyrone ou son dihydro-dérivé), on distingue :

- ❖ les flavones et les flavonols,
- ❖ les flavanones, les flavanols et les dihydroflavanols (Figure 20).

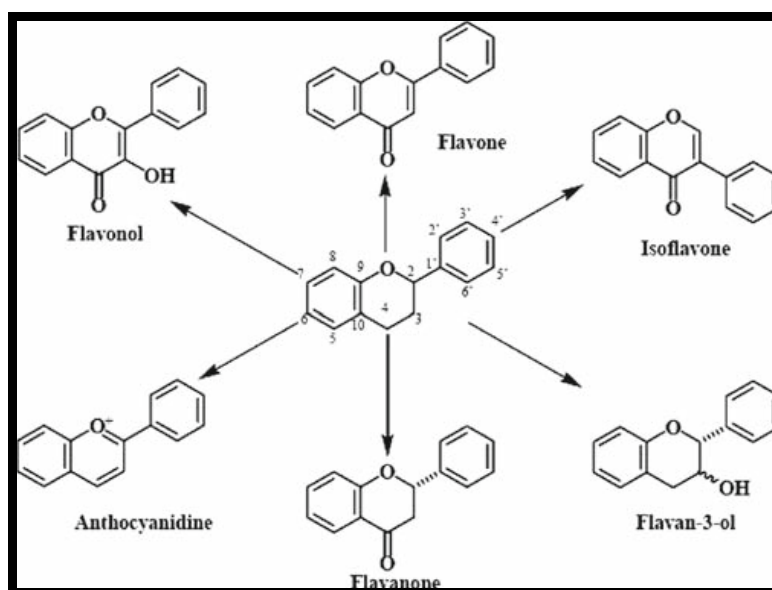


Fig.20 : Structures de base des principaux flavonoïdes [Chira et al., 2008].

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) [Di Carlo et al., 1999 ; Havsteen, 2002].

3. Pharmacocinétique

Seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être réabsorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient

que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire [Di Carlo et al., 1999 ; Ghedira, 2005].

Après hydrolyse, environ 15 % des flavonoïdes aglycones sont absorbés sous forme de micelles (en présence de la bile) par les cellules épithéliales et arrivent dans la lymphe puis le foie via le système porte. Environ 80 % des flavonoïdes sont captés par le foie lors de leur premier passage [Havsteen, 2002].

Dans le sang, une partie des flavonoïdes se retrouve liée à la sérum albumine alors qu'une autre partie est retrouvée sous forme conjuguée avec l'acide glucuronique et les sulfates grâce à leurs nombreux groupement hydroxyyles, tout en gardant leurs propriétés antioxydantes [Di Carlo et al., 1999 ; Havsteen, 2002]. Les formes conjuguées sont excrétés dans la bile et la possibilité d'un cycle entérohépatique a été proposée [Di Carlo et al., 1999].

Les flavonoïdes ne sont ni accumulés ni stockés par le foie. Dans les hépatocytes, ils sont transportés vers l'appareil de Golgi (Figure 21) et probablement aussi vers les peroxysomes où ils subissent une dégradation oxydative. Leurs produits de décomposition (acide caféique et acide cinnamique ainsi que leurs dérivés) sont complètement excrétés avec l'urine à un taux semblable à celui de la caféine [Havsteen, 2002].

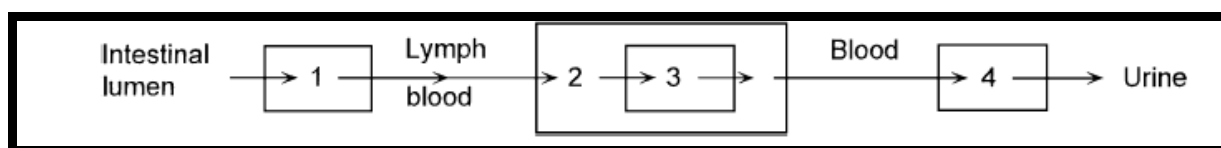


Fig.21: Schéma de la pharmacocinétique des flavonoïdes chez les animaux supérieurs. Passage des flavonoïdes (1) à travers les cellules épithéliales intestinales ; puis dans la la lymphe (2) et le sang, dans l'hépatocyte; l'appareil de Golgi (3) ou peroxysome; de nouveau dans le sang et enfin excrétion par les cellules du tubule rénal (4) [Havsteen, 2002].

4. Activités biologiques des flavonoïdes

4.1. Action anti-oxydante

Les flavonoïdes peuvent agir contre l'oxydation de deux manières distinctes : soit en protégeant les lipides cibles des initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la phase de propagation. Dans le premier cas, les flavonoïdes dits préventifs (ou retardeurs), empêchent la formation ou piègent les ROS responsables de l'initiation de l'oxydation. Dans le second cas, les flavonoïdes sont dits briseurs de chaîne, interceptent les radicaux propagateurs de l'oxydation (lipoperoxyradicaux, ou LOO^*) ou participent indirectement à l'interruption de l'oxydation radicalaire en chaîne [Cillard et Cillard, 2006 ; Laguerre et al., 2007].

4.1.1. Effet préventif

Grâce à leur structure, les flavonoïdes chélatent les métaux de transition comme le fer et le cuivre impliqués dans la génération de radicaux libres. Ils forment des complexes ou des composés de coordination avec les métaux inhibant ainsi le cycle redox du métal ou forment des complexes métalliques insolubles [Cillard et Cillard, 2006 ; Laguerre et al., 2007].

4.1.2. Effet briseur de chaîne ou *chain breaking*

Dans le cadre de la peroxydation lipidique, les flavonoïdes, grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif, vont le plus souvent céder un radical hydrogène (H^{*}) aux radicaux lipoperoxylys propagateurs (LOO^{*}), interrompant ainsi la réaction de propagation radicalaire de l'oxydation.

D'un point de vue théorique, la capacité du phénol à céder un atome d'hydrogène peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison O-H (bond dissociation energy, BDE). Plus la BDE d'un phénol est faible, plus son caractère donneur d'atome H est élevé.

La réactivité du radical issu de l'antioxydant vis-à-vis des lipides insaturés est un paramètre à prendre en compte. Ce devenir est généralement gouverné par la capacité de l'antioxydant à stabiliser l'électron non apparié par délocalisation. De ce point de vue, la structure aromatique et la présence éventuelle de groupements encombrants confèrent aux radicaux phénoliques une bonne stabilité. En général, on explique la meilleure efficacité antioxydante des ortho-diphénols par la stabilisation du radical phenoxy AO^{*} au moyen de la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire [Laguerre et al., 2007].

4.2. Propriétés inhibitrices d'enzymes

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de nombreuses enzymes appartenant à différentes voies métaboliques. Dans certains cas, l'inhibition est compétitive mais le plus souvent elle est de type allostérique.

L'inhibition inclue l'aldose réductase, la phospholipase A2, la cyclooxygénase, lipo-oxygénase, les hydrolases, les oxydoréductases, l'ADN synthétases, l'ARN polymérases, phosphatases, les protéines phosphokinases, les oxygénases, les acide aminé oxydases et la DNA topoisomerase II.

Malgré la disparité d'enzymes que les flavonoïdes inactivent, ils n'entraînent pas des perturbations de tout métabolisme mais affectent juste quelques voies. Ce faible effet, de la part de composés chimiquement très réactifs, s'expliquerait en partie par leur faible hydrosolubilité qui permet de les garder en faible concentration, ainsi qu'à leur courte demi-vie [Havsteen, 2002].

CHAPITRE 6
MATERIEL ET
METHODES

Matériel et méthodes

A. Etude chimique de la propolis

1. Matériel

La propolis a été récoltée dans la wilaya de Jijel au sein de la «Coopérative Apicole de Kaous, Jijel» par les apiculteurs entre Avril et Mai 2005.

Elle est récoltée par grattage des cadres présents à l'intérieur des ruches. La propolis ainsi récoltée est de la propolis brute, elle est gardée à +4°C dans des flacons sombres en plastiques.

2. Extraction

La propolis à l'état brute ne peut pas être utilisée, elle doit être d'abord purifiée. La purification est réalisée à froid, en trois étapes: 1) dissolution dans de l'alcool ; 2) filtration ; 3) décantation.

2.1. Principe

La propolis est dissoute dans un solvant polaire pour séparer les éléments indésirables (40% de cire, pollen et autres impuretés) et ne conserver que les éléments actifs (résines, baumes, huiles essentielles, polyphénols).

Ethanol est le solvant polaire le plus utilisé pour avoir une propolis dépourvue de cire et de débris organiques et riche en polyphénols. Il est souvent utilisé sous forme de base hydro-alcoolisée de 70 % et de 80 %, bien que d'autres concentrations ont été aussi utilisés, tels que 95 % ou sous forme d'éthanol [Gómez-Caravaca et al., 2006]. Cependant la concentration de 70% reste la valeur de choix la plus utilisée pour l'extraction de composés biologiquement actifs de la propolis (principalement les composés phénoliques incluant différents types de flavonoïdes).

La méthode traditionnelle (la macération), a été employée pour l'extraction des composés phénoliques, méthode exigeant beaucoup un temps de macération long, 2 à 10 jours [Trusheva et al., 2007].

2.2. Déroulement de l'extraction

Un échantillon de propolis, réduit en petits morceaux, est utilisé pour préparer l'extrait éthanolique de propolis (EEP) à 10% (10g de propolis dans 100 ml d'éthanol 95%). L'extraction est réalisée à l'abri de la lumière et à la température ambiante avec agitation. 15 jours plus tard, le mélange est filtré sur un tissu. Le filtrat est soumis à une évaporation à basse pression à 80°C

(Rotavapor, Buchi 461). Le résidu est repris avec de l'éthanol 70% pendant une nuit. La solution organique obtenue distillée sous pression réduite jusqu'à siccité, fournit un résidu pesant 40g.

Afin de séparer les flavonoïdes en fraction aglycone et glycosylés, le résidu est repris par une base hydroalcoolique (méthanol/eau, v/v). La solution hydroalcoolique obtenue est épuisée successivement par l'éther de pétrole (élimination des graisses), 3 fois par l'éther diéthylique (permet de récupérer les aglycones flavoniques libres), l'acétate d'éthyle (permet d'extraire les aglycones polyhydroxylés et la plupart des flavonoïdes glycosylés).

2.3. Les flavonoïdes dans les extraits

2.3.1. Recherche qualitative

Dans ce travail, les flavonosides ou flavonoïdes glycosylés ont été recherchés sans élimination préalable des flavonoïdes aglycones se trouvant éventuellement dans l'extrait à 10 %. Ils sont mis en évidence après hydrolyse chlorhydrique par extraction à l'éther et réaction de la cyanidine de Shibata [Debray, 1970].

2.3.2. Recherche quantitative

Le dosage différentiel des flavonoïdes est effectué en se basant sur les propriétés chélatantes d' AlCl_3 à 2% en solution dans l'éthanol 95 % (0.5 ml de EEP+ 0.5 ml de AlCl_3 2%). Après un repos de 10min, le spectre est balayé de 380 à 460nm et l'absorbance maximale est retenue. L'absorbance du pic différentiel (spectrophotomètre UV visible, type Shimadzu 1601) contre un blanc ne contenant pas d' AlCl_3 est proportionnelle à la concentration de l'échantillon en aglycones flavoniques. La teneur en aglycones, exprimée en équivalent de quercétine (EQ), est calculée selon la formule [Alyane et al., 2008]:

$$\text{Flavonoïdes Totaux} = (A/\epsilon) \times M \times V \times d/p \text{ (en mg EQ/g)}$$

A : Absorbance du pic différentiel

ϵ : Coefficient d'absorption molaire de la quercétine (= 23000)

M : Masse molaire du quercétine (= 366)

V : Volume de la solution éthanolique d'aglycones

d : Facteur de dilution

p : Poids de matière sèche (extrait de la propolis en gramme)

3. Méthodes chromatographiques analytiques

3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Le résidu provenant de la précédente extraction est soumis à une CCM. Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes soit d'un gel de silice Silicagel 60 F254, Merck (CCM monodimensionnelle) soit de cellulose (CCM bidimensionnelle). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. La phase mobile est constituée d'un mélange tertiaire de solvants.

Les proportions sont données en volume et ils sont classés par polarité croissante :

- ❖ CCM monodimensionnelle : t-BuOH-AcOH-H₂O (3/1/1)
- ❖ CCM bidimensionnelle : solvant A : t-BuOH-AcOH-H₂O (3/1/1) ; Solvant B : AcOH 6%

L'observation des CCM s'effectue en lumière UV (Lampe DESAGA UV-VIS, 254 nm, 365 nm) après révélation un réactif approprié : réactif de Neu (Révélateur des flavonoïdes).

3.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC/DAD-UV)

EEP obtenu a été soumis à une analyse chromatographique par HPLC en phase inverse (RP-HPLC). Pour cela, 20µl de chaque fraction ont été injectés sur une colonne de type C-18 Nucleodur (Machery-Nagel Duren, Germany) 5µm, de dimensions égales à 250mmX4.6mm. La phase mobile est constituée de deux éluants: l'acide trifluoroacétique 0.01% (A) et l'acétonitrile (B). Le gradient d'élution appliqué est de type linéaire, étalé sur 70 min, commençant avec de 10% d'acide trifluoroacétique/90% d'acétonitrile et finissant avec l'acétonitrile à 100% (Tableau ci-dessous). Le débit est de 1 ml/min.

La détection a été effectuée par un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD-UV) Prostar® Varian à longueur d'ondes variables de 200 à 700nm.

<i>Temps (min)</i>	<i>Solvant A (%)</i>	<i>Solvant B (%)</i>
0	90	10
10	90	10
50	50	50
65	50	50
70	0	0
80	0	0
85	90	90

4. Activité anti-radicalaire par le test au DPPH°

4.1. Principe

L'activité anti-radicalaire du EEP a été évaluée *in vitro*, par le test au DPPH°. Le DPPH° (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl) de couleur violette, vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2-diphényl 1-picrylhydrazine. Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 515 nm. Pour cela, des volumes, contenant des quantités équivalentes d'extraits éthanoliques de propolis à celles des composés témoins (quercétine et vitamine E) ont été incubés avec une solution éthanolique de DPPH° à 100 µM. La solution de DPPH° est préparée à l'avance (au moins 3 à 4 heures) car la solubilisation est difficile et ne se conserve pas plus de 48 h à l'obscurité.

4.2. Déroulement de l'expérience

A 1.5 ml de solution éthanolique de DPPH° 100 µM sont additionnés 15 µl de la solution à tester. Après agitation et à des intervalles de temps réguliers (30 sec), les absorbances à 515 nm ont été enregistrées pendant 5 min.

Les résultats obtenus pour chaque dilution testée sont exprimés par rapport à ceux obtenus pour la vitamine E et la quercétine, pris comme référence.

B. Partie galénique

1. Les lipides et liposomes

Tout au long de ce travail de thèse nous n'avons préparé qu'un seul type de liposomes de 2^{ème} génération. Ces vésicules ont été préparées à partir d'un mélange de lipides : phosphatidylcholine hydrogénée du jaune d'œuf (HEPC: Hydrogenated Egg Yolk Phosphatidylcholine), de 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoéthanolamine N-[Méthoxy(polyéthylène-glycol)2000] ou DSPE-PEG(2000) et de cholestérol. Nous avons décidé d'utiliser le mélange HEPC/DSPE car ce sont deux lipides dont la longueur des chaînes hydrophobes est presque identique et dont les températures de transition de phase sont proches. De plus, le DSPE est pégylé ce qui confère aux liposomes le caractère furtif vis-à-vis du système immunitaire. Le cholestérol, quant à lui, a été ajouté au mélange car il augmente la rigidité de la vésicule.

2. Méthodes

Nous avons utilisé différentes méthodes expérimentales pour mener à bien nos objectifs : synthèse et caractérisation des liposomes. Ces méthodes sont les suivantes : préparation des liposomes, extrusion, diffusion dynamique de la lumière (DLS), potentiel zêta (ζ), gel chromatographie, microscopie électronique en transmission.

2.1. Fabrication des liposomes

2.1.1. Principe

La méthode de préparation la plus simple des liposomes est celle de *Bangham* (1965) dite également méthode d'hydratation d'un film lipidique. Elle consiste à évaporer le solvant organique dans lequel les lipides ont été dissous. Un film de molécules lipidiques est alors formé sur la surface interne du récipient après l'évaporation du solvant. Ce film est alors mis au contact avec un solvant aqueux afin de l'hydrater. Cette opération doit se dérouler dans des conditions de température dépendant de la nature du (ou des) lipide(s) choisi(s), car les liposomes ne se forment qu'à une température supérieure à celle de la transition de phase (cristal liquide vers gel) des lipides. Souvent une agitation est nécessaire afin d'accélérer la mise en suspension des lipides. Dans le milieu aqueux, le film lipidique s'hydrate et les phospholipides s'associent de manière à ne pas exposer leur partie hydrophobe au solvant. Il en résulte la formation de bicouches, qui se referment sur elles mêmes en emprisonnant du solvant. Ces bicouches enferment en général d'autres bicouches, toutes séparées par une couche d'eau. Des vésicules multilamellaires (MLVs) sont ainsi obtenues. La structure de celles-ci ressemble à celle d'un oignon [Lorin et al., 2004].

2.1.2. Déroulement de l'expérience

Pour la synthèse de liposomes, il est indispensable de fixer au préalable trois paramètres: le rapport molaire des différents constituants lipidiques (HEPC/Chol/ DSPE-PEG: 1.85/1/0.15), la concentration finale en lipides (5mM) et le volume final de la suspension de liposomes (10ml)

La formule suivante a été utilisée pour calculer la masse de chaque lipide:

$$\text{Masse du lipide (g)} = \text{Fraction molaire (\%)} \times \text{CF} \times \text{VF} \times \text{M}$$

%: taux d'un lipide considéré dans le liposome

CF: concentration finale en lipides totaux dans la suspension de liposomes

VF: volume final de la suspension de liposomes

M: masse molaire du lipide considéré

La température de transition de phase (Tc) du HEPC est inconnue, il a fallu la calculer en se basant sur son indice d'iode (Ii) et sur la formule : $T_c = 52.4135 - 0.6658 I_i$ [Moufti et al., 1990]

Indice d'iode du HEPC est directement lu sur la notice du produit fourni par Lipoid GmbH. Cet indice est de 3 ce qui donne une Tc de 50.41°C.

Mode opératoire

Le mélange de lipides (37.432mg) est dissout dans du chloroforme (2 à 3ml) puis transvasé dans un ballon en forme de poire de 100ml suivie d'une évaporation du solvant sous vide au

évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R-215, Suisse) à la température ambiante. Un fin film lipidique se forme sur les parois du ballon au fur et à mesure de l'évaporation du solvant.

Afin d'éliminer totalement le chloroforme, le ballon est mis sous vide pendant une heure suivie d'un passage sous un flux d'azote pendant 2min.

La réhydratation du film lipidique est effectuée à 70°C (au dessus de la T_c) par addition de 10ml d'une solution aqueuse (sulfate d'ammonium 250 mM, pH5.4, température 70°C), quelques billes en verre sont ajoutés (pour faciliter le décollage du film lipidique). Une agitation vigoureuse pendant 5min au vortex compléter au évaporateur rotatif à 70°C pour achever la formation de liposomes. La formation d'une solution trouble, laiteuse et légèrement bleutée, indique la formation de liposomes [Ogawara et al., 2008].

2.2. Calibrage de la suspension de liposomes (Extrusion)

La méthode de Bangham permet l'obtention d'une population de liposomes très hétérogène du point de vue taille et nombre de bicouches lipidiques. L'homogénéisation de la suspension de liposomes peut être obtenue par différents procédés physiques, entre autre l'extrusion sous pression d'azote à travers des membranes de polycarbonates dont le diamètre des pores est bien défini.

L'extrusion se fait à une température supérieure à la T_c . De multiples passages permettent de réduire progressivement l'hétérogénéité de la suspension liposomale par usage de membranes de diamètres de pores décroissants. Le mécanisme d'homogénéisation est simple et consiste en une diminution du nombre de lamelles des vésicules sans rupture de la structure vésiculaire [Fattal et al., 1993].

2.2.1. Déroulement de l'expérience

La réduction de la taille des liposomes multilamellaires obtenus est réalisée par passage de la suspension de liposomes 5 puis 10 fois à 70°C à travers des membranes de polycarbonate (Whatman, Maidstone, Kent, UK) dont la taille des pores est de 0.2 μ m et de 0.1 μ m de diamètre respectivement sous pression d'azote par un extruder (nitrogen-driven Lipex lipid extruder, northern lipids Inc., Burnaby, BC, Canada).

Après l'extrusion, les échantillons de liposomes sont conservés à 4°C et sous atmosphère inerte (azote) afin d'éviter leur oxydation avec l'oxygène de l'air.

2.3. Mesure de la taille des liposomes

La diffusion dynamique de la lumière (DLS), parfois appelée spectroscopie par corrélation de photons ou diffusion quasi élastique de la lumière est une méthode importante pour la caractérisation de la granulométrie de systèmes colloïdaux. Cette technique est fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules (mouvement aléatoire des particules provoqué par les

impacts des molécules du solvant sur la surface de la particule). La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant : à une viscosité donnée, plus la particule est petite et plus son mouvement brownien présente une fréquence et une amplitude relative importante. De même, plus la valeur de la viscosité du solvant est faible (température plus élevée par exemple), plus ce mouvement brownien est rapide et ample pour une particule de taille donnée.

L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet la détermination d'une distribution de coefficient diffusion lui-même proportionnel au diamètre hydrodynamique des particules. Elles sont converties en distribution de taille à l'aide de théories établies [Anonyme, 2004].

2.3.1. Déroulement de l'expérience

La taille des liposomes, dispersés dans du sulfate d'ammonium pH5.4, a été mesurée à 25°C par la diffusion quasi-élastique d'un rayon laser monochromatique d'un dispositif commercial le Zetasiser Nano ZS Zen 3600 (Malvern instruments Ltd, UK) dans les conditions suivantes : viscosité de 0.8945 centipoise et indice de réfraction du dispersant 1.335.

Après la préparation des liposomes, la solution est prélevée et introduite dans une cuve jetable en polystyrène dont les quatre faces sont polies. La solution est introduite de manière à remplir suffisamment la cuve (environ 2 ml) afin que le faisceau laser monochromatique traverse le cœur de la solution. Ensuite, la cuve est insérée dans l'appareil et les mesures peuvent être menées. La distribution de taille obtenue résulte de la moyenne de 3 mesures sur un échantillon donné.

2.4. Mesure du potentiel Zeta zêta (ζ)

Le potentiel Zeta représente la charge que la particule acquiert lorsqu'elle mise en suspension dans un liquide et est mesuré au plan de cisaillement entre la double couche des ions adsorbés à la surface et la phase continue. Il dépend du pH, de la force ionique ou de la concentration d'un composant particulier. La mobilité des particules soumises à l'électrophorèse est mesurée par une technique appelée l'électrophorèse laser Doppler. Cette mobilité électrophorétique mesurée est convertie en potentiel Zeta grâce aux théories adéquates [Anonyme, 2004].

2.4.1. Déroulement de l'expérience

Le potentiel zêta des liposomes dispersés dans de l'eau milliQ est mesuré aussi par spectroscopie en autocorrélation de la diffusion quasi-élastique d'un rayon laser monochromatique (Zetasizer Nano ZS Zen 3600, Malvern instruments Ltd, Malvern, UK) à 25°C, après dilution au 50^{ème} par l'eau milliQ ; cette solution est ensuite disposée dans une cuve jetable de mesure du potentiel

zêta dans les conditions suivantes : viscosité de 0.8945 centipoise et indice de réfraction du dispersant 1.335. Chaque mesure a été réalisée 3 fois durant 1 minute.

2.5. Encapsulation du principe actif

Il existe deux méthodes d'encapsulation des molécules hydrosolubles: la méthode passive consistant en la dissolution du principe actif dans la solution de réhydratation, méthode permettant d'avoir des taux d'encapsulation faibles et la méthode active qui consiste à introduire les substances à encapsuler dans des liposomes préformés. Les molécules diffusent à travers la membrane et se retrouvent piégées à l'intérieur des liposomes [Fattal et al., 1993]. Il existe plusieurs techniques d'encapsulation active dont celle par génération d'un gradient de pH transmembranaire, méthode utilisée dans notre travail

2.5.1. Principe

Le pH du compartiment aqueux intraliposomal est déterminé par la nature de la solution de réhydratation. Ainsi le pH intraliposomal est rendu acide par utilisation d'une solution de réhydratation de pH acide il suffit alors d'ajuster le pH du compartiment extraliposomal à 7 ou plus par addition d'une base ou par changement de la solution externe par une autre de pH alcalin en utilisant une colonne de chromatographie; ainsi un gradient de pH transmembranaire est généré et utilisé pour l'encapsulation du principe actif [Tardi et al., 2006].

Cette méthode d'encapsulation est également appelée encapsulation contrôlée (remote-loading technique) car l'encapsulation du principe actif dans les liposomes préformés est basé sur la perméabilité de la membrane liposomale à la forme neutre des bases faibles comme la doxorubicine [Fenske et Cullis, 2007].

2.5.2. Déroulement de l'expérience

Pour éliminer la phase extraliposomale acide (sulfate d'ammonium) et la remplacée avec une solution de PBS pH8, la solution de liposomes est filtrée à travers une colonne de Sephadex G-25 medium (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare Ltd, Sweden), équilibrée avec du PBS pH8.

2ml de la suspension liposomale sont déposés au sommet de la colonne ; les liposomes seront exclus du gel alors que le sulfate d'ammonium serait retardé. L'élution par une solution de PBS pH8 permet de récupérer les liposomes dans les premières fractions et le sulfate d'ammonium est éliminé lors du lavage de la colonne. A la fin, on obtient une suspension de liposomes dans la phase externe est du PBS pH8 alors que la phase interne est acide (sulfate d'ammonium pH 5.4) : ainsi un gradient de pH transmembranaire est généré.

Pour l'encapsulation, les liposomes vides avec un gradient de pH transmembranaire sont incubés avec de la doxorubicine (10mg/ml, dans du PBS pH8) dans un rapport doxorubicine/ lipides de 1/20 (w/w) pendant une heure à 60°C [Ogawara et al., 2008 ; Ishida et al., 2008].

2.6. Détermination du taux d'encapsulation

Quand on utilise des liposomes pour piéger des substances actives, il est indispensable d'éliminer l'excès de substance qui n'a pas été encapsulée. A partir de là, on pourra estimer le pourcentage d'encapsulation et étudier ensuite le relargage du soluté en fonction du temps ou des conditions du milieu.

La chromatographie sur gel de Sephadex G-25 (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare Ltd, Sweden) a été utilisée pour la séparation de la fraction du principe actif non encapsulé (voire plus haut).

La doxorubicine encapsulée est ensuite quantifiée par spectrophotométrie à 483nm (Shimadzu UV-vis spectrophotometre, Japan) après lyse des liposomes avec du SDS 10% (w/v, eau MilliQ) [Mayer et al., 1990]:

A 200 µl des liposomes on a ajouté 800µl de SDS 10% suivit d'une agitation dynamique au vortex pendant quelques minutes. Pour le blanc, 200µl de liposomes vides sont utilisés. La formule suivante est utilisée pour le calcul du pourcentage d'encapsulation:

$$\text{Taux d'encapsulation (T.E\%)} = (\text{quantité de doxo encapsulée} / \text{quantité de doxo initiale}) \times 100$$

2.7. Etude de la stabilité des liposomes

L'étude de stabilité des liposomes (vides et chargés) en fonction du temps et sous différentes conditions (température ambiante, à 4°C, sous la lumière et à l'abri de cette dernière) sur une formulation contenant 10% de liposomes dans du NaCl 0.9%.

La mesure de la taille a été retenue comme critère de stabilité. La mesure et l'évolution de la taille dans le temps est suivie par diffusion quasi-élastique de la lumière (Zetasizer Nano ZS Zen 3600, Malvern instruments Ltd, Malvern, UK), cette mesure est effectuée chaque semaine sans dilution préalable de la suspension de liposomes. La distribution de taille obtenue résulte de la moyenne de 3 mesures sur un échantillon donné.

2.8. Microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission (MET) est largement exploitée dans le domaine des sciences submicroniques pour l'observation des structures des différentes formulations. Les observations des échantillons de liposomes sont réalisées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Philips EM 208 (Centre Commun de Microscopie Electronique, UMR 8080, CNRS/université Paris XI à Orsay-ville). Les observations sont réalisées sous une tension

d'accélération maximale de 60kv, une résolution théorique de ≈ 0.1 nm et un grossissement maximal de 39000 fois. La numérisation des images est réalisée grâce à une caméra numérique bas niveau de lumière, modèle AMT Advantage HR3 (Capteur CCD 1,3 millions de pixels, 1024 x 1024) piloté par le logiciel d'acquisition AMT Image Capture Engine.

2.8.1. Préparation et observation des liposomes vides et avec doxorubicine

Il est possible d'observer la suspension liposomale directement sans aucune préparation préalable.

La suspension de liposome a été diluée avec du tampon PBS à 1/10 pour atteindre une concentration en lipides totaux de 3.42mM, puis une goutte de la suspension est déposée sur un support ultra-mince adapté. Ce support universel est une grille de Nickel 400 mesh avec un film Formvar (polyvinyl formal resin) recouvert d'une couche très mince de carbone amorphe. Cinq minutes plus tard, temps suffisant pour que les liposomes adhèrent à la surface du film, l'excédent de liposomes a été enlevé avec du papier filtre. Ensuite une goutte d'agent de contraste (solution de phosphotungstate 1% à pH 7,25) est déposée sur la grille pendant 5minutes afin de réaliser une coloration négative qui permet de contraster l'échantillon et de mettre en relief les liposomes (le tungstène est un métal lourd, opaque aux électrons et ne réagit pas avec la préparation). Après séchage de la grille, elle est observée par microscopie électronique à transmission.

C. Etude *in vitro*, cultures cellulaires

1. La lignée cellulaire

A la différence des cultures primaires, les lignées cellulaires ont la possibilité de se multiplier indéfiniment. Dans notre travail, on a utilisé la lignée cellulaire H9c2, composée des cellules adhérentes.

Les cellules H9c2 sont issues du tissu cardiaque embryonnaire du rat norvégien *Rattus norvegicus*, souche BD1X. Cette lignée qui présente plusieurs des propriétés du muscle squelettique, fut créée par Kimes et Brandt [Ellis et al., 2009].

2. La culture des cellules H9c2

Les cellules H9c2 (CRL 1446) ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Tissue and Cell Collection, USA) et sont cultivées dans des boîtes de Pétri stériles de 10cm de diamètre (TPP Tissue culture dishes, Suisse) contenant un milieu de culture standard composé du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco ou DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cambrex, USA) contenant des vitamines, acides aminés, D-glucose 4,5 g/L, L-glutamine 584 mg/L et 3,7 g/L de NaHCO₃, additionné de 10% de sérum de veau fœtal ou SVF (qui apporte les facteurs de croissance et cytokines

nécessaires à la prolifération des cellules), de 100 U/ml de pénicilline et de 100µg/ml de streptomycine.

Le milieu contient du rouge phénol (indicateur de pH) ce qui lui donne une couleur rouge et vire vers le jaune quand il devient acide suite à l'accumulation des produits de métabolisme cellulaire. Il est changé tous les deux jours.

Les boîtes de pétri sont incubées dans une enceinte thermostatée à 37°C, dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO₂ et en air 95% [Youn et al., 2005].

Le passage des cellules est réalisé tous les 4 jours. La quantité de cellules à ensemercer est calculée pour assurer une reprise rapide de la croissance ainsi que pour éviter l'obtention d'une culture à confluence avant le passage suivant, assurant ainsi le maintien en permanence de toute la population cellulaire en phase exponentielle de croissance.

3. Etude de la toxicité de la doxorubicine in vitro

Dans ce travail les cellules H9c2 en préférence des cardiomyocytes primaires car il est difficile d'isoler et de conserver en vie ces dernières. Comme les H9c2 sont des cellules isolées du cœur, elles peuvent être considérées comme un bon modèle pour les cardiomyocytes mais il faut éviter la différenciation en limitant le nombre des passages.

Les cellules H9c2 sont mises en culture selon le protocole fourni par ATCC (voir plus haut).

3.1. Test MTT (Tests de viabilité cellulaire)

3.1.1. Principe

Le test au MTT [Mosmann, 1983] est utilisé pour comparer la croissance des cellules témoins à celle des cellules traitées par des molécules dont on veut étudier la toxicité ou pour l'évaluation du nombre de cellules viables. Il est basé sur la réduction des sels de tétrazolium ou MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale, enzyme active seulement dans les cellules avec un métabolisme et une chaîne respiratoire intacts.

3.1.2. Déroulement de l'expérience

Les cellules H9c2 sont ensemençées en plaques 96 puits (TPP, test plat, Suisse) selon la densité requise (15000 cellules/puits dans 200µl de milieu de culture complet) et cultivées pendant 48h avant l'addition de la doxorubicine.

Les myocytes H9c2 en culture ont été exposées à différentes doses de doxorubicine (1µM, 3µM, 5µM, 10µM, 15µM, 20µM, 25µM, 30µM et 100µM concentration finale) pendant des temps différents (3, 6, 9 et 20h). Des puits sans doxorubicine ont servi de témoins. Pour chaque temps

étudié, 20µl de la solution de MTT (Sigma) (5 mg/ml, en tampon PBS) sont ajoutés dans chaque puits sauf un qui est laissé comme blanc. Après 2h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, le milieu est éliminé par aspiration, et les cristaux de MTT formés sont solubilisés par addition de 200µl de DMSO (Biobasic INC). L'absorbance est mesurée à 570nm, par un lecteur de plaques ELISA (Labsystems multiskan RS-232C, Finland). Les blancs de lecture correspondent à du milieu à 10 % de SVF contenant du MTT et du DMSO.

Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle : $(DO \text{ moyenne des cellules traitées} / DO \text{ moyenne des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$; ou présentés sous forme de courbes retraçant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps.

3.2. Test de la mort cellulaire

L'apoptose provoquée par les anthracyclines peut être initiée par des altérations dans l'ADN et les membranes cellulaires, via la génération d'espèces radicalaires, impliquant in fine l'activation des caspases effectrices, en particulier la caspase-3 ainsi que la libération de lactate déshydrogénase (LDH).

3.2.1. Principe

La mesure de LDH dans le surnageant des cellules traitées par la doxorubicine offre une voie simple pour détecter la présence de dommages causés aux mitochondries ainsi qu'une perte de l'intégrité de la membrane plasmique, deux critères de la mort cellulaire. A la différence des autres enzymes cytoplasmiques (TGO, TGP, Phosphatases acides et alcalines) la LDH est un enzyme stable présente dans le cytoplasme de toutes les cellules.

La présence de LDH dans le milieu de culture cellulaire est détectée par une réaction couplée responsable de la conversion du sel tetrazolium jaune en un colorant rouge (sel de formazan) absorbant à 492 nm. La quantité de formazan convertit est directement proportionnelle au taux de LDH dans le milieu, qui est directement proportionnelle à son tour au nombre de cellules mortes ou lysées (Roche Diagnostics GmbH, cat no: 11644793001, Mannheim, Germany).

4. Etude de la capture cellulaire de la doxorubicine libre et encapsulée par les cellules H9C2

Pour l'analyse de la capture cellulaire de la doxorubicine libre et encapsulée par les cellules H9c2, deux méthodes ont été retenues : la cytométrie de flux et la microscopie de fluorescence. Ces analyses ont été réalisées au sein de l'équipe Génopole à Evry.

4.1. Préparation des cellules

Les cellules H9c2 sontensemencées la veille de l'étude à raison de 200000 cellules/puits sur plaque de 6 puits dans un volume final de 2 ml de milieu complet. 2 plaques ont été préparées avec 4 puits remplis dans chacun.

De plus afin d'étudier également les interactions entre les cellules et les liposomes vides, des liposomes fluorescents ont été préparés. Ainsi à la composition en lipides précédemment utilisée pour la préparation des liposomes a été ajoutée 75µl d'une solution de Lissamine™ rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Rhodamine B-DHPE) à 5mg/ml représentant approximativement 1% de la masse totale de lipide de la suspension. A noter que la Rhodamine B-DHPE donne une couleur rose intense aux liposomes. Cette molécule de Rhodamine B (Figure 21) est fluorescente et est ainsi facilement et à peu de frais détectable par des instruments appelés spectrofluoromètres.

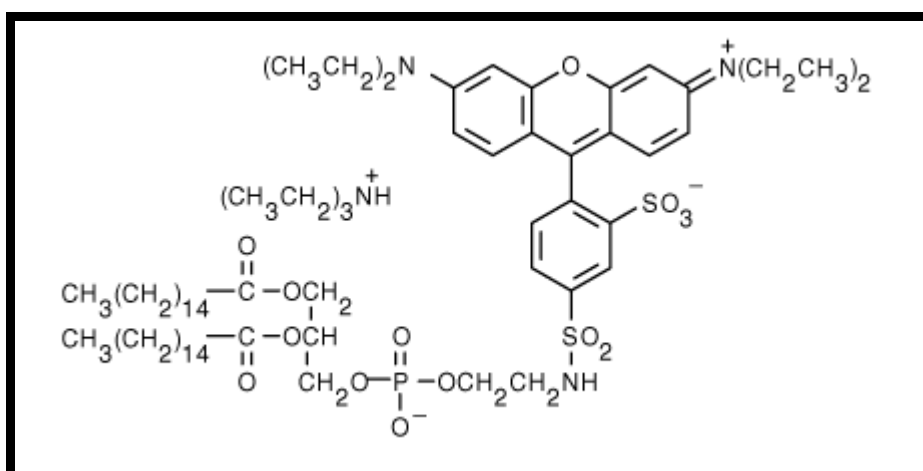


Figure 21 : Molécule de Rhodamine B-DHPE

Dans chaque plaque, 4 puits ont été occupés selon les compositions suivantes :

Puits 1 ou témoin négatif : ne contenant que des cellules H9c2.

Puits 2 ou témoin positif: Cellules en présence de 40µl de la solution de doxorubicine libre afin d'avoir également une concentration de 20µM.

Puits 3 : Cellules en présence de 40µl de liposomes chargés en doxorubicine afin d'avoir une concentration de 20µM.

Puits 4 : Cellules en présence de 540µl de liposomes fluorescents, volume choisie pour avoir la même quantité de lipides qu'avec les liposomes de doxorubicine.

Dans une plaque, les cellules ont été analysées après 3h de contact avec les différents produits et dans l'autre l'analyse a été faite 20h après les additions.

4.2. Cytométrie de flux

Pour l'analyse de la capture de la doxorubicine libre et encapsulée par les cellules, un cytomètre en flux de type FACSCalibur from Becton Dickinson (Bohemia, NY 11716 USA) à été utilisé ainsi que son logiciel d'acquisition et d'analyse des données CellQuest 3.1f (BD). Celles-ci se font à partir de suspensions monocellulaires obtenues comme suit:

une fois les temps d'incubations souhaités observés, les plaques sont vidées de leur milieu, et les cellules sont lavées au PBS puis détachées de leur support de culture et dissociées par l'action d'une solution de trypsine-EDTA 0.5% à 37°C. Les cellules sont alors resuspendues dans 10 volumes de PBS. Avant l'analyse, chaque échantillon est soigneusement resuspendue avec un vortex. L'analyse est réalisée sur 10000 évènements correspondant à des cellules morphologiquement intactes.

La mesure de l'intensité de la lumière diffractée en 90° ou side scatter (SSC) par rapport à l'intensité de la lumière diffractée dans l'axe ou forward scatter (FSC) est enregistrée pour révéler la population de cellules pertinente. Pour déterminer le taux de doxorubicine associée aux cellules H9c2, cette dernière a été excitée avec un rayon laser d'argon (488 nm) et la fluorescence a été recueillie à 585nm \pm 21 nm (filtre FL2).

4.3. Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence à été utilisée pour déterminer la localisation ou la distribution intracellulaire de la doxorubicine libre ou non dans les cellules cardiaques (excitation/émission : 480/540nm).

Le microscope utilisé au laboratoire est un microscope à fluorescence (Nikon (Optiphot-2 avec un AF-D épi-illuminateur 100 W et d'une lampe au mercure) sur lequel un module coaxial-confocal avec une roue Nipkow (Technical Instruments, model K2 BIO) a été ajouté (résolution de profondeur optimale était de 0.5 mm).

Le microscope est équipé d'un objectif Zeiss à immersion à eau X63. La source lumineuse d'excitation est une lampe à mercure à haute pression. Des filtres d'émission de fluorescence appropriée ont été utilisés pour la doxorubicine.

Les cellules utilisées pour les expériences en cytométrie de flux à 20h ont été examinées dans les puits avant traitement avec la trypsine.

Les images sont acquises sur une caméra CCD (Micromax, Instruments de Princeton, Evry, France) et analysées à l'aide du logiciel IpLab (Scanalytics, Fairfax, VA).

D. Etude in vivo

1. Espèce animale utilisée

Les rats mâles adultes de type Wistar RjHan:WI pesant entre 175-199 g, âgés de 5 semaines fourni par Janvier (France) sont inclus dans l'étude en raison d'une abondante littérature scientifique sur ces animaux et aussi suite de leurs utilisation dans les expérimentations antérieures du laboratoire concernant la toxicité cardiaque de la doxorubicine. La souche a été créée au Wistar Institute vers 1906, à partir d'un stock de l'Université de Chicago.

2. Conditions d'hébergement des animaux

La stabulation des animaux se fait dans une animalerie périphérique dédiée aux rats et dont l'ambiance est contrôlée (T° : $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, humidité relative : $50 \pm 10\%$, bruit inférieur à 50 db, cycle lumineux de 12 heures par jour avec la lumière à 8 heures) dans des cages rectangulaires fabriqués en matière plastique opaque à raison de 6 rats/cage.

Comme le protocole ne s'est y oppose pas, la nourriture et la boisson sont servies *ad libitum*.

La nourriture de rat est de type A04C fourni par SAFE (Scientific Animal Food and Engineering, Route de Saint Bris 89290 AUGY). Elle est composée d'ingrédients naturels préparés commercialement sous forme de croquettes. Une pesée hebdomadaire des rats ainsi qu'une pesée quotidienne de la nourriture est réalisée.

Les animaux ont été répartis en 3 lots selon le type de traitement par la doxorubicine (lot doxo), ou par une solution de NaCl 0,9%(lot contrôle), ou par des liposomes (lot lipo)

3. Traitement

La doxorubicine (CHEMOS GmbH, Regenstauf, Germany), est utilisée non pour son action anticancéreuse mais pour son effet cardiotoxique. Elle est solubilisée dans une solution de NaCl 0.9% immédiatement avant l'injection (la dissolution n'est complète qu'après un léger chauffage au bain-marie). Cette injection est réalisée par voie intrapéritonéale (IP) 24h avant le sacrifice des animaux à la dose de 30mg/kg. Les animaux du lot contrôle reçoivent par IP le même volume de solvant (NaCl 09%).

Le lendemain, les animaux sont euthanasiés par injection d'une dose de pentobarbital (22mg/100g), la paroi abdominale est ouverte, le diaphragme est incisé et le cœur est excisé et pesé, puis coupé en deux parties : l'une utilisée pour l'isolement de mitochondries et l'autre moitié pour les dosages tissulaires (glutathion et TBARS).

Le sang est prélevé par ponction des veines jugulaires, puis stocké dans des tubes à hémolyses secs, déposés dans la glace en attente de centrifugation (1000 RPM, 10 min). Le surnageant est aliquoté puis congelé à -20°C pour le dosage d'enzymes sériques.

Pour l'étude de l'effet de l'extrait de propolis, les animaux ont été répartis également en 3 lots :

Groupe 1(8 rats) : animaux recevant 1.25 ml de l'extrait brut de la propolis (flavonoïdes) à la dose quotidienne de 100mg/kg par voie orale pendant 7 jours.

Groupe 2 (8 rats) : les animaux sont prétraités par les flavonoïdes de la propolis à la dose quotidienne de 100mg/kg pendant sept jours. La doxorubicine 10mg/kg est administrée au 7ème jour par voie intraveineuse.

Groupe 3 (8 rats) : Les animaux de ce groupe sont traités par la doxorubicine seule à la dose de 10mg /kg au 7ème jour par voie intraveineuse.

Les animaux sont sacrifiés à 24 h, 7 jours, 15 jours et 60 jours après l'administration du médicament anticancéreux.

Le traitement des rats par la doxorubicine est entamé cinq jours plus tard suivant le schéma décrit ci-dessus après le premier prélèvement de sang.

Chaque semaine, 3 rats sont sacrifiés, leurs cœurs prélevés chirurgicalement et pesés.

Une pesée hebdomadaire des rats ainsi qu'une pesée quotidienne de la nourriture est réalisée.

4. Dosages des enzymes sériques

L'activité sérique de quatre enzymes à savoir, l'alanine aminotransférase (ALAT ou TGP), l'aspartate aminotransférase (ASAT ou TGO), la créatine kinase cardiaque (CK-MB) et la lactate déshydrogénase (LDH) à été mesurée comme étant un indice sur l'atteinte cardiaque par utilisation de kits BIOLABO (France). Pour le dosage, il suffit de suivre les instructions du fabricant.

5. Dosages tissulaires et étude de mitochondrie

Pour extraire un organe des cellules, il est d'abord nécessaire de casser les cellules dans des conditions douces, c'est-à-dire en utilisant des solutions aqueuses, et en évitant les valeurs extrêmes de pH, de pression osmotique et les températures élevées. La plupart des étapes d'isolement sont réalisées à des températures de 0 à 4°C (le travail se fait en contact de la glace).

Les organes et leurs cellules peuvent être convenablement cassés par homogénéisation, procédé dans lequel un pilon est tourné manuellement, ou à l'aide d'un moteur, dans un tube de verre de dimensions convenables renfermant des fragments émincés de l'organe étudié et un milieu d'homogénéisation approprié. La suspension résultante qui contient de nombreux organites intacts s'appelle l'homogénat.

Le sous-fractionnement des constituants de homogénat est réalisé par centrifugation différentielle. La méthode comporte trois étapes de centrifugation à des vitesses croissantes chacune donnant un culot et un surnageant. Le surnageant sera soumis à une nouvelle centrifugation à vitesse supérieure

dans l'étape suivante. Ce procédé donnera trois culots, appelés fractions nucléaire (noyaux et cellules non lysées), mitochondriale (mitochondries, lysosomes et peroxysomes) et microsomale (ribosomes libres, RE, RER); le dernier surnageant d'aspect clair correspond approximativement au cytoplasme ou liquide cellulaire [Murray, 2002].

5.1. Dosages tissulaires

5.1.2. Dosage du glutathion (Sedlak et Lindsay, 1967)

Le glutathion (L-glutamyl-L-cystéinyglycine), thiol libre de bas poids moléculaire le plus abondant dans les cellules eucaryotes, est un tripeptide synthétisé par toutes les cellules de l'organisme ; le foie reste la source principale [Halliwell et Gutteridge, 2007]. Le glutathion existe sous deux formes chimiques, la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH) qui représente 98 à 99 % du glutathion total. La fonction sulfhydryle (-SH) est à l'origine de la grande réactivité et du puissant pouvoir réducteur de ce mercaptan. Le glutathion réduit permet la détoxification de certains xénobiotiques électrophiles, l'inactivation des composés oxygénés réactifs (peroxydes, radicaux libres, etc.). [Boutolleau et al., 1997].

Pour l'évaluation du taux de glutathion réduit chez les rats, nous avons utilisée la méthode de Sedlak et Raymond 1967 utilisant le réactif d'Ellman. Il s'agit d'une réaction chimique évoluant en une seule étape suivie d'une détection colorimétrique. Le réactif d'Ellman (Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou DTNB est réduit par les groupes thiol (SH) pour donner une mole d'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque par mole de SH. L'acide mercaptobenzoïque est un anion ayant une intense coloration jaune et par conséquent peut être utilisée pour évaluer les groupes thiols (SH).

5.1.2.1. Déroulement de l'expérience

0.4g de cœur sont coupés et homogénéisés dans 8ml EDTA 0.02M. A 0.5 ml de l'homogénat sont ajoutées 1.5ml de tampon Tris 0.2M (pH8.2 dans EDTA 0.02M) et 0.1ml de DTNB 0.01M en méthanol absolu. Le volume est complété à 10ml par du méthanol absolu, puis incubé pendant 15min à température ambiante. Le mélange est centrifugé à 3000 RPM pendant 15min. L'absorbance du surnageant est lue à 412nm contre le blanc (0.5ml eau MilliQ + 1.5ml 0.2M Tris + 0.1ml DTNB 0.01M).

5.1.3. Dosage du MDA: Test TBARS (Ohkawa et al., 1978)

Les marqueurs de la peroxydation lipidique utilisés en biologie clinique dérivent de l'attaque de l'ensemble des acides gras polyinsaturés (diènes conjugués, aldéhydes), ou de l'attaque d'une famille particulière d'acides gras polyinsaturés (F2 isoprostanes, 4-hydroxynonénal) [Lefèvre et al., 1998]. Parmi les aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, le plus connu est le

malondialdéhyde (MDA). C'est le beta-dialdéhyde tricarboné le plus simple, produit lors de la coupure des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons. Il peut également être formé à partir de composés non lipidiques tels que l'acide ascorbique, les acides aminés, le désoxyribose ou le saccharose lorsqu'ils sont exposés à l'action des radicaux hydroxyles, en présence de métaux par exemple [Janero, 1990].

La réaction de dosage du MDA, décrite par *Kohn et Liversedge*, en 1944, précisée par *Patton et Kuntz* en 1951, repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol. La réaction colorée, observée avec le TBA, mesure non seulement le MDA préexistant, mais aussi le MDA formé de manière artefactuelle par décomposition thermique des peroxydes, et de ceux générés au cours même de la réaction. Le résultat du dosage du MDA par le TBA est donc la somme du MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du MDA, soit à des molécules réagissant avec le TBA en milieu acide et à chaud. C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du MDA s'est substituée la notion de « substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique » (thiobarbituric acid reactive substances ou TBARS) [Lefèvre et al., 1998 ; Laguerre et al., 2007].

5.1.3.1. Déroulement de l'expérience

Le rat est euthanasié par injection IP de pentobarbital (22mg/100g). Le cœur est chirurgicalement extrait, pesé et rapidement plongé dans du NaCl 0.9% glacé (4°C). Le cœur est ensuite lavé avec du NaCl 0.9% pour éliminer le sang puis coupé en morceau et abondamment rincé à nouveau pour éliminer un maximum de sang et les morceaux de cœur sont ensuite finement broyés dans un potter en verre avec du KCl 1.15% (1g tissu/ 9ml KCl 1.15%).

A 0.5 ml de l'homogénat brut sont ajoutés 0.5ml de TCA 20% et 1 ml de TBA (0.67% dans NaOH 50 mM). Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15minutes, refroidi à l'eau de robinet pour stopper la réaction puis 4 ml de n-butanol sont ajoutés et le tout est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 RPM. L'absorbance du surnageant est lue à 534nm contre un blanc fait de 0.5 ml d'eau MilliQ traité de la même façon.

La valeur de TBARS est définie comme étant la quantité de MDA, exprimée en μM , présente dans 1 g d'échantillon.

5.2. Extraction des mitochondries de cœur

5.2.1. Déroulement de l'expérience

Deux tampons sont utilisés: le tampon d'homogénéisation (225mM mannitol, 75 mM sucrose, 10mM HEPES, pH 7.4), compléter avec de l'EGTA (1mM) et du BSA (0.1 mg/ml) lors de l'utilisation et le tampon de lavage: identique au le tampon d'homogénéisation mais sans EGTA et BSA. Toutes les étapes d'isolement de mitochondries se font au contact de la glace.

Le cœur est recueilli chirurgicalement après sacrifice de l'animal, pesé et mis rapidement dans un bûcher. L'organe est rincé au tampon d'homogénéisation puis coupé en morceau et abondamment rincé à nouveau pour éliminer un maximum de graisse et de sang. Les morceaux de cœur sont ensuite finement broyés dans un potter en verre contenant le tampon d'homogénéisation (10 volumes). L'homogénat est transvasé dans deux tubes de 15ml puis centrifugé 7 minutes à 480xg (2100 RPM) à 4°C pour enlever les débris cellulaires indésirables. Le surnageant est récupéré et conservé à 4°C alors que le culot est remis en suspension dans 5ml de tampon d'homogénéisation puis il est centrifugé pendant 7 minutes à 480xg (2100 RPM) à 4°C pour avoir un maximum de mitochondries. Les deux surnageants contenant les mitochondries sont combinés puis centrifugés à 7700xg (8500 RPM) à 4°C pendant 7 minutes.

Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est repris avec le tampon de lavage (5ml). La suspension de mitochondries est centrifugée à 7700xg (8500 RPM) à 4°C pendant 7 minutes puis le culot est resuspendu dans 1ml de tampon de lavage. La solution mitochondriale est immédiatement placée dans la glace à 4°C [Green et Leeuwenburgh, 2002 ; Tokarska-Schlattner et al., 2007].

5.3. Dosage des protéines (Lowry 1951)

La technique mise au point par Lowry (1951) utilisant le réactif de *Folin* et *Ciocalteu* (1927) pour le dosage des phénols a été employé pour quantifier les protéines dans les préparations de mitochondries. Ce taux de protéines reflète globalement la quantité de mitochondries dans la suspension de mitochondries isolées [Waterborg et Matthews, 1986].

5.3.1. Déroulement de l'expérience

100µl de suspension de mitochondries purifiées diluée à 1/20 avec du NaCl 0.9% (ou 100µl eau MilliQ pour le blanc) sont ajoutés à 1000µl de réactif de Lowry. Après agitation au vortex, le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante.

Ensuite 100µl de réactif de Folin dilué à ½ sont ajoutés sous agitation. Après incubation pour 30 minutes à l'obscurité (réaction photosensible) l'absorbance à 760nm est lu contre le blanc.

La concentration en protéine mitochondriale en mg/ml est ensuite déterminée sur la courbe d'étalonnage de BSA.

5.4. Mesure de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries

5.4.1. Principe

La production de radicaux libres oxygénés ou ROS par les mitochondries peut être suivie par la mesure de la synthèse de l'anion superoxyde.

Les méthodes utilisées pour la mesure de la synthèse de l'anion superoxyde par les mitochondries, isolées du cœur de rat, se chevauchent avec les techniques utilisées pour la mesure de l'activité de la SOD. Elles sont basées sur l'aptitude de l'anion superoxyde à réduire le nitrobleu de tétrazolium ou NBT (de couleur jaune) en un composé de couleur bleue foncée: le diformazan, par addition de 4 électrons lors d'un processus très complexe. Le complexe absorbe fortement à 560nm [Halliwell Gutteridge, 2007].

5.4.1.1. Déroulement de l'expérience

Dans un volume final de 1.2 ml du tampon respirant (50mM sucrose, 100mM KCl, 5mM KH₂PO₄ pH7.4), on ajoute des mitochondries 1mg/ml, de la cyclosporine A 1 μ M (la cyclosporine A exerce inhibe l'ouverture du pore de transition de perméabilité, bloque en conséquence la libération du cytochrome C dans le cytosol; par ce mécanisme, elle est un inhibiteur de l'apoptose), du NBT 100 μ M. Après une minute d'incubation, on ajoute le substrat de la chaîne respiratoire: succinate 6mM (substrat du complexe II),

La mesure se déroule pendant 5-10 minutes à 560nm pour détecter la production de ROS résultante. La Roténone 1 μ M (inhibiteur du complexe I) est ajoutée avant directement dans le tampon respirant. La mesure se déroule à nouveau pendant 5-10 minutes pour déterminer l'effet produit en fonctions des différents substrats.

Ces mesures sont effectuées à l'état 4 de la respiration (sans couplage avec la production d'ATP).

L'utilisation de la roténone (inhibiteur du complexe I) permet de déterminer l'importance relative des différents complexes dans la production de ROS.

5.6. Détermination de la concentration en cytochromes (a+a3, b, c, et c1) de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les cytochromes sont des coenzymes intermédiaires de la chaîne respiratoire localisés dans la membrane mitochondriale interne. Leur dosage permet d'appréhender la composition de cette dernière pour les mitochondries isolées du cœur de rats Wistar soumis à un traitement par la doxorubicine encapsulée ou non. Le spectre d'absorption des cytochromes varie selon leur degré d'oxydoréduction. La méthode de dosage utilisée est celle de *Williams* 1964.

5.6.1. Déroulement de l'expérience

2mg de mitochondrie de cœur sont solubilisées dans 2ml de Triton X-100 à 2% (diluer avec du tampon phosphate 0.1M pH 7.0). Après agitation, le lysat mitochondrial est versé à part égale dans deux cuves (1ml par cuve) qui sont placées dans un spectrophotomètre à double faisceau (lecture de l'absorbance d'une cuve contre l'autre).

Dans la cuve «échantillon», les cytochromes sont réduits par addition de quelques cristaux de dithionite de sodium pour réduire le fer héminique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}), agiter jusqu'à dissolution complète des cristaux et le mélange est mis au repos pendant une minute. Dans la cuve «de référence», les cytochromes des mitochondries sont oxydés par addition d'un petit cristal de ferricyanure de potassium afin d'oxyder tout le fer du hème en fer ferrique (Fe^{+3}). La cuve est couverte avec du parafilm, inversée plusieurs fois et mise au repos pendant une minute. La densité optique est lue au spectrophotomètre à double faisceaux entre 500 et 700 nm, forme réduite contre forme oxydée.

La différence de densité optique entre les spectres réduits et oxydés à des longueurs d'onde précises permet de calculer la concentration en cytochromes des mitochondries isolées de cœur de rats, grâce aux équations de Williams [Williams, 1965].

- ❖ La concentration en cytochrome c est déterminée par la différence entre DO 550nm et DO 535nm ou A15.
- ❖ La concentration en cytochrome c1 est déterminée par la différence entre DO 554nm et DO 540nm ou A25.
- ❖ La concentration en cytochrome b est déterminée par la différence entre DO 563nm et DO 577nm ou A35.
- ❖ La concentration en cytochrome a+a3 est déterminée par la différence entre DO 605nm et DO 630nm ou A45

La concentration en cytochrome totale des mitochondries isolées du cœur de rats est déterminée par la somme de la concentration en cytochromes a+a3, b, c et c1.

Les résultats seront exprimés sous forme de moyenne plus écart standard à la moyenne en micromol/ml.

Equations de Williams (1964):

$$[\text{Cytochrome a}] = E45$$

$$[\text{Cytochrome b}] = D35 + 0.0263 [\text{Cytochrome a}]$$

$$[\text{Cytochrome c1}] = C25 - 0.0484 [\text{Cytochrome a}] - 0.225 [\text{Cytochrome b}]$$

$$[\text{Cytochrome c}] = B15 - 0.03 [\text{Cytochrome a}] + 0.149 [\text{Cytochrome b}] - 0.491 [\text{Cytochrome c1}]$$

$$B15 = A15/21$$

$$C25 = (A25 - 6.51 B15)/15.6$$

$$D35 = (A35 + 1.16 B15 - 1.48 C25)/13.8$$

$$E45 = (A45 + 0.22 B15 + 0.482 C25 - 0.076 D35)/12$$

5.7. Etude du gonflement mitochondrial ou swelling

Une des bases de la théorie chimio-osmotique, formulée par *Peter Mitchell* en 1961 postulant que le gradient de concentration de protons crée à travers la membrane sert de réservoir d'énergie libre pour la synthèse d'ATP "réservoir d'énergie libre de Gibbs", est l'imperméabilité de la membrane mitochondrial interne aux solutés non dotés de systèmes de transport spécifiques. Cette imperméabilité peut être perdue suite à l'altération de la membrane mitochondriale par les radicaux libres ou suite à l'incorporation de composés pouvant former le pore [Zoratti et Szabb, 1995].

5.7.1. Déroulement de l'expérience

Les changements dans le volume matriciel mitochondrial, qui accompagnent l'ouverture du PTP, sont suivis par mesure de la décroissance de l'absorbance de la solution de mitochondries à 540nm. La mesure est effectuée en présence de roténone (pour interdire le transfert électronique inverse du complexe II au complexe I) étant donné que le succinate est utilisé comme substrat énergétique.

Dans un volume final de 1,8ml tampon de gonflement (Sucrose 200mM, Tris-MOPS 10mM pH7.2, KH_2PO_4 10mM) supplémenté par de la roténone 1 μM , 0.25mg/ml de mitochondries sont introduit. Après une minute d'incubation, 260 μM de calcium sont ajoutés. La réaction est déclenchée par addition de 6mM de succinate. La décroissance de l'absorbance à 540nm est enregistrée pendant 15minutes. Une deuxième mesure est fait avec la cyclosporine A 1 μM est ajoutée avant l'addition du calcium [Zhou et al., 2001b].

6. Traitement statistique

Les données sont traitées de façon statistique par des tests de Student (observation pairées ou non) ainsi que par des analyses de variance à un facteur (ANOVA) à l'aide du logiciel Excel 2003 afin de déterminer s'il existait des différences significatives entre les valeurs des différents échantillons. Toutes les analyses sont réalisées au seuil de signification de 5%. Pour la p-valeur, des étoiles sont utilisées afin d'indiquer l'importance de la signification (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

CHAPITRE 7
RESULTATS ET
DISCUSSION

Résultats et discussion

A. Etude Chimique de la propolis

1. Composition qualitative

Les essais préliminaires sur notre extrait de propolis, ont montré la présence de flavonoïdes en quantité importante (réaction de la cyanidine: $Mg^{+} HCl$: coloration violette intense). Leur quantification sur extrait sec, déterminée par réaction colorimétrique avec les chlorures d'aluminium, a donné un taux égale à 370mg EQ/g de matière sèche.

L'identification des composés présents dans l'extrait de propolis est basée sur la comparaison de leurs temps de rétentions obtenues en HPLC et de leurs spectres UV avec ceux décrits par la littérature étant donné la non disponibilité des composés authentiques ou de références. Ainsi, l'examen des spectres UV et de l'HPLC de notre extrait nous permet juste d'interpréter de façon générale les spectres de la propolis.

L'analyse qualitative après CCM mono- et bidimensionnelle (voire annexe) de l'extrait de propolis a révélé la présence de deux types de composés qui réagissent avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune-verte sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type phénolique [Wagner et Bladt, 2001].

Les spectres UV des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV1205 UV-Vis Shimadzu permettant des lectures directes contre liquide de compensation. Les mesures se font dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm.

Les spectres UV (Figure 22) ont permis de révéler la présence de trois catégories de composés :

- ❖ Le spectre UV montre deux maxima d'absorption à 280 nm et 290 nm correspondant aux absorptions des deux cycles A et B de composés de type flavonoïde : dihydrochalcone ou flavanone [Jacquemin et al ., 1985].
- ❖ Le spectre UV présente deux maxima d'absorption à 280 nm et 370 nm. Ces deux absorptions correspondent aux absorptions des cycles A et B d'un flavonoïde où le cycle B est conjugué : chalcone ou flavone.
- ❖ Le spectre présente un maxima d'absorption à 225nm correspondant à des acides phénoliques (dérivés d'acide hydroxycinnamique).

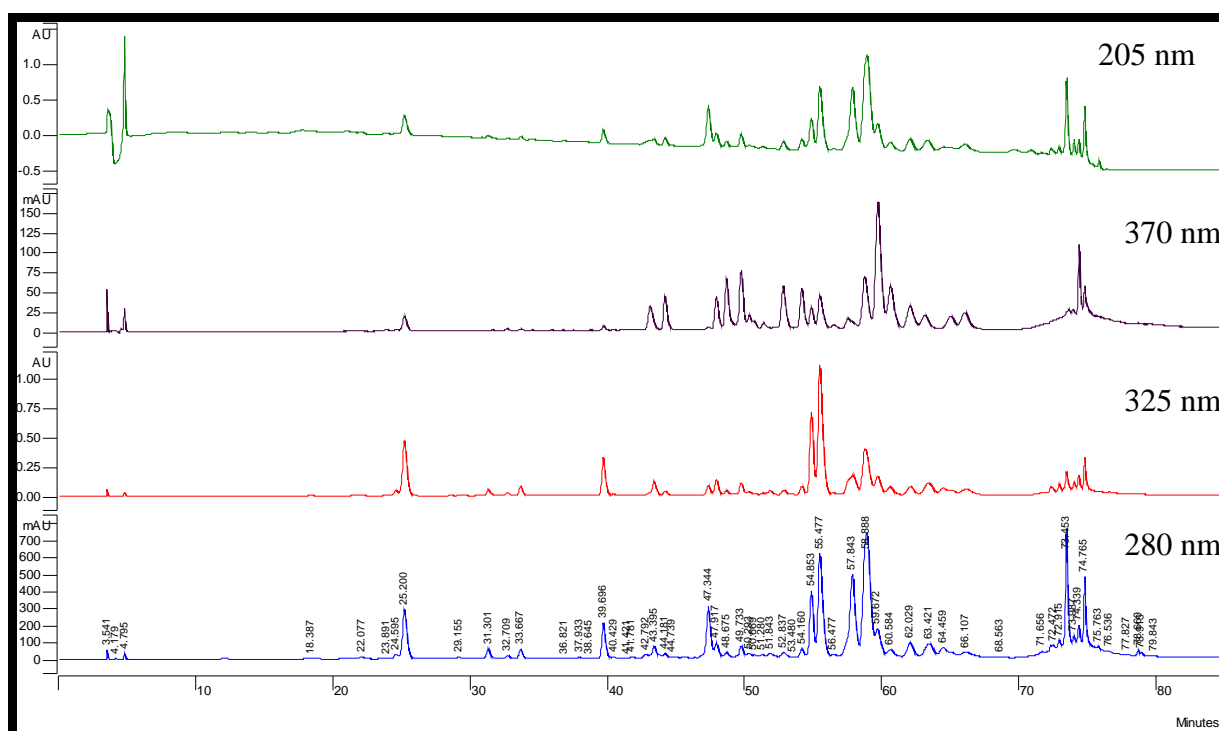


Fig.22: chromatogramme HPLC de l'extrait de propolis mesuré par un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD-UV) à longueur d'ondes variables de 200 à 700nm.

En HPLC, les résultats enregistrés (Figure 22) confirment ceux obtenus en spectrométrie UV. La séparation étant réalisée en phase inverse, le temps de rétention sera inversement proportionnel à la polarité des composés; les plus polaires sortiront les premiers. En fonction du temps de rétention, on pu identifier :

4 acides phénoliques (pics 25.2 min ; 39.6 min; 54.8 min; 55.4 min), 6 flavonoïdes (Rt: 47.893min, 48.693min, 49.733min, 52.827min, 54.133min, 60.64min) et 6 Chalcones (Rt : 47.333min, 57.867min, 58.72min, 58.907min, 73.44min, 74.747min). Il y a un composé mineur présent dans l'EEP qui n'a pu être identifié. Ce composé a un temps de rétention de 59.68min dans les spectres UV (voir annexe).

2. Activité anti-radicalaire par le test au DPPH°

Après incubation avec le DPPH° à une concentration de 100µM, les cinétiques de décoloration à 515 nm ont été déterminées pour chaque composé (Figure 23). On remarque que notre extrait présente une capacité de capture des radicaux libres nettement supérieure à celle de la vitamine E et de la quercétine, composés pris comme référence.

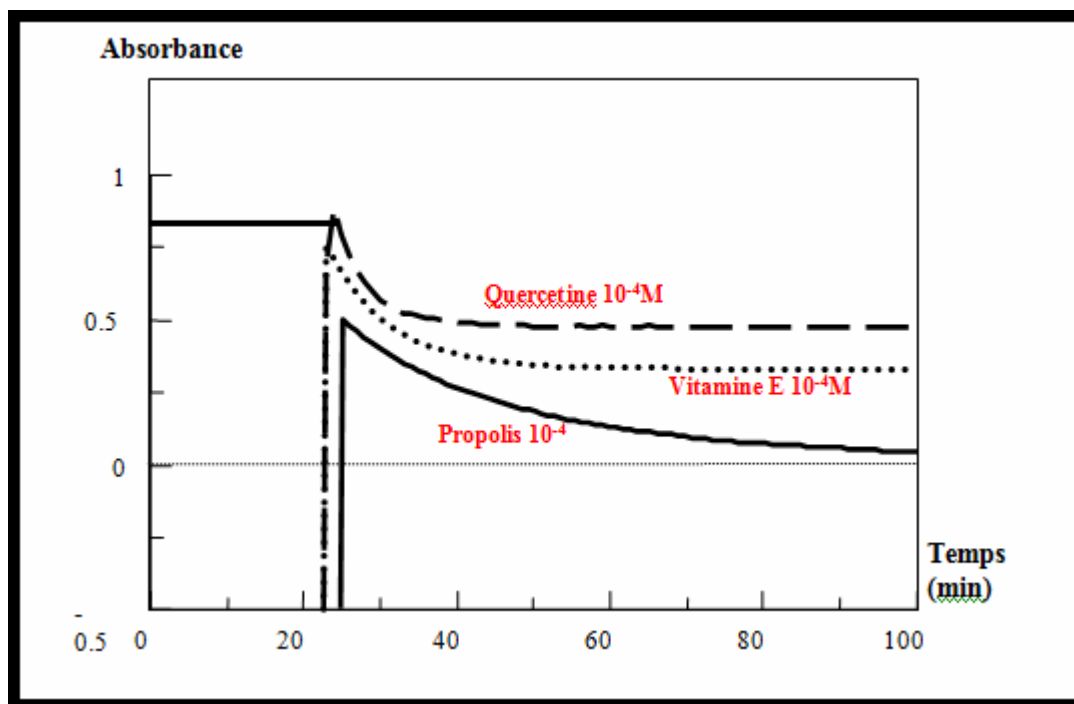


Fig.23: cinétique de décoloration du DPPH° par l'extrait de propolis, vitamine E et la Quercétine suivie par la décroissance de l'absorption à 515 nm.

Ainsi notre étude montre une corrélation significativement positive entre les composés phénoliques extrait à partir de la propolis et l'activité anti-oxydante comme l'ont montré différents auteurs [Lahouel et Fillastre 2004 ; Kumazawa et al., 2004].

Cette activité anti-radicalaire des flavonoïdes est due au fait que ces derniers inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Ainsi, ils sont capables de céder un radical hydrogène (H[•]) aux ROS interrompant ainsi la réaction de propagation radicalaire de l'oxydation mode d'action leur a valu le nom de briseur de chaîne ou «chain breaking» [Ghedira, 2005 ; Laguerre et al., 2007].

D'un point de vue théorique, la capacité du phénol à céder un atome d'hydrogène peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison O-H (bond dissociation energy, BDE). Plus la BDE d'un phénol est faible, plus son caractère donneur d'atome H est élevé [Laguerre et al., 2007].

En outre, la réactivité du radical issu de l'antioxydant est un paramètre à prendre en compte. Ce paramètre est généralement gouverné par la capacité de l'antioxydant à stabiliser l'électron non apparié par délocalisation. De ce point de vue, la structure aromatique et la présence éventuelle de groupements encombrants confèrent aux radicaux phénoliques et entre autres les flavonoïdes une bonne stabilité [Laguerre et al., 2007].

En outre, les flavonoïdes sont des chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre impliqués dans la génération de radicaux libres. Ils forment des complexes ou des composés de coordination avec ces métaux inhibant ainsi leur cycle redox [Cillard et Cillard, 2006].

B. Formulation (galénique)

1. Taille des liposomes

La Figure 24 représente la distribution en taille des liposomes. Le diamètre moyen pondéré en pourcentage d'intensité, après extrusion à travers des membranes de polycarbonates (0.2 μ M 5 fois et 10 fois 0.1 μ M) et mesuré par DLS était de 107 \pm 1nm avec un indice de polydispersité (PDI, défini comme le rapport de l'écart type sur le diamètre moyen) de 0.045 ; la solution est donc monodisperse. Après encapsulation, la taille a été remesurée et elle était de l'ordre de 106 \pm 1nm avec un PDI égal à 0.075 (suspension toujours monodisperse) ; ainsi on note la conservation de la taille des liposomes.

La méthode de production des liposomes suivie dans notre étude conduit à une excellente reproductibilité de la distribution en taille des liposomes obtenus puisque le diamètre moyen ne varie que très peu entre les différents lots de liposomes réalisés avec notre formulation.

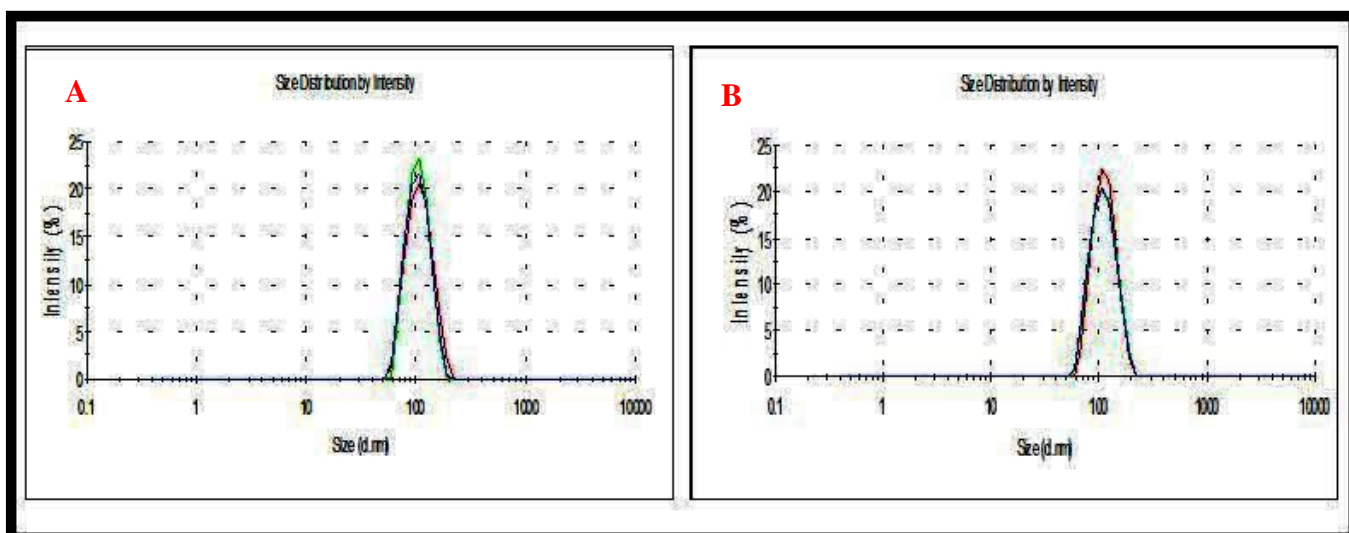


Fig.24: Distribution en taille (pondération en pourcentage d'intensité) de la suspension de liposomes avant (A) et après (B) encapsulation.

Malgré l'utilisation de lipides neutres (non chargés) la mesure du potentiel zéta ζ avant et après encapsulation a révélée la présence d'une charge négative, -20.5 \pm -0.2mV et -20.4 \pm 0.9mV respectivement, ceci est probablement du à une adsorption d'ions à la surface des liposomes.

En effet, on trouve assez souvent une charge négative pour des liposomes avec phosphatidylecholine: la présence des quelques acides gras non estérifiés dans la

phosphatidylecholine et le fait que le phosphate de la tête polaire est plus proche à la surface que le NH_4^+ de la choline.

2. Taux d'encapsulation

L'encapsulation de la doxorubicine par la méthode active via un gradient de pH transmembranaire permet de générer deux forces motrices permettant l'entrée de la doxorubicine à l'intérieur des liposomes: effet de synergie. Ceci permet d'atteindre des taux élevés d'encapsulation avoisinant le 100% [Fenske et Cullis, 2007 ; Ogawra et al., 2008] 70% dans notre cas. Cette différence dans le taux d'encapsulation s'expliquerait par la différence dans la composition en lipides entrant dans la structure de la membrane liposomiale ainsi que par la différence de sels utilisés pour la génération du gradient de pH [Abraham et al., 2002 ; Fritze et al., 2006].

La membrane liposomiale par sa nature hydrophobe n'est perméable qu'aux molécules neutres. A pH neutre ou alcalin, la doxorubicine libre (base faible, $\text{pKa}=8.6$) est non chargée diffuse librement à travers la bicouche lipidique (Figure 25) vers l'intérieur du liposome où son groupement amine sera protoné (le pH intraliposomal est acide) ce qui empêche une diffusion en sens inverse du médicament [Fenske et Cullis, 2007].

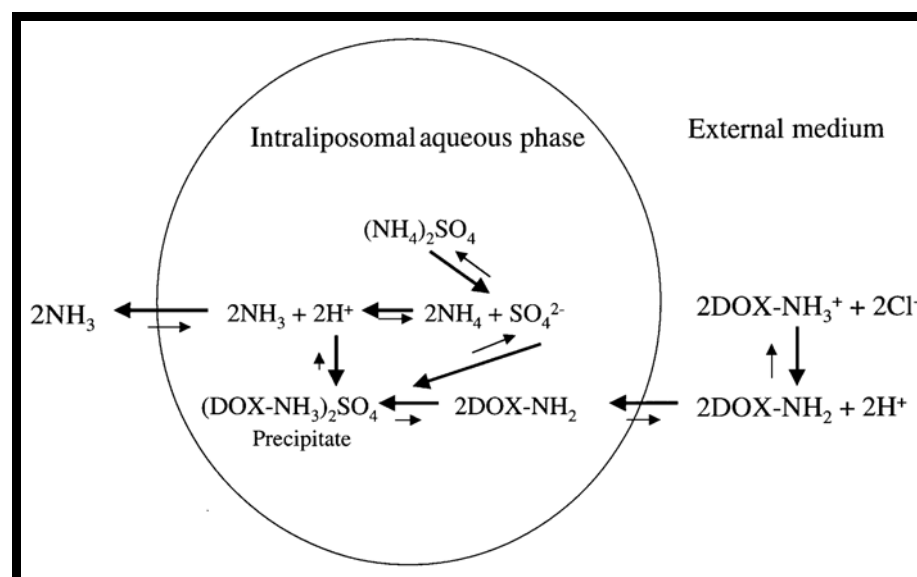


Fig. 25: mécanisme de l'encapsulation active de la doxorubicine [Barenholtz, 2001].

Ainsi, d'autres molécules de doxorubicine (non chargées) vont continuer à diffuser vers l'intérieur en fonction du gradient de concentration du médicament : tant que la capacité tampon du milieu aqueux interne est capable de maintenir ce gradient de pH transmembranaire par libération de protons afin de compenser ceux fixés par le médicament, ce dernier continu de diffuser de l'extérieur vers l'intérieur ce qui permet d'obtenir des taux d'encapsulation très élevés par rapport à la méthode

passive. En fin, une partie de la doxorubicine qui diffuse précipite ce qui permet de maintenir le gradient de concentration du médicament qui continue ainsi à diffuser d'où la génération d'une force supplémentaire d'encapsulation [Fenske et Cullis, 2007].

3. Stabilité et évolution dans le temps

Aucune opacification des solutions de liposomes vides ou chargés n'est observée au cours de leur conservation (température ambiante, 4°C, sous lumière ou à l'abri de la lumière) pendant les 5 semaines de l'étude. Cela indique l'absence de formation d'agrégats dont la grande taille suffirait à troubler les solutions. Cette observation visuelle est confirmée lorsque l'on compare les spectres de distribution en taille d'une suspension de liposomes vides ou chargés réalisés juste après le début de l'étude avec les distributions mesurées chaque semaine. Aucune différence significative ($p > 0.05$) n'est observée, (Figure 26 et 27) d'où l'éventuelle intégrité de la membrane liposomale.

La stabilité de la structure membranaire s'expliquerait par la nature des phospholipides utilisés pour la préparation des liposomes. D'une part, il s'agit de lipides saturés et par conséquent moins sujets à la peroxydation lipidique par l'oxygène de l'air [Barenholtz, 2001]. D'autre part, la présence de cholestérol au sein de la membrane lipidique tend à la rigidifier. Cette rigidification provient du fait que le cholestérol engendre un effet de condensation forte dans la membrane lipidique, faisant ainsi diminuer l'aire occupée par les molécules de lipides [Machy et Leserman, 1987] cet effet contribue à augmenter la stabilité chimique de la membrane liposomale contre la peroxydation et l'hydrolyse par les phospholipases [Barenholtz, 2001].

La non agrégation des liposomes (pas d'opacification de la suspension de liposomes) serait due à la charge électrique présente à leur surface comme en témoigne la mesure du potentiel zéta ainsi qu'à la présence des chaînes de PEG. De plus, la mise en suspension des liposomes en milieu aqueux (NaCl 0.9%) permet de les garder sous atmosphère hydrophile ce qui permet de maintenir la dispersion des liposomes empêchant ainsi leur fusion.

En fin, un autre mécanisme pourrait contribuer à la stabilité des liposomes chargés en doxorubicine. Lors de la fabrication des liposomes nous avons utilisé le sulfate d'ammonium comme solution de réhydratation. Or, la doxorubicine présente une faible solubilité dans sulfate ($> 2\text{mM}$) ce qui minimiserait la pression osmotique à l'intérieur des liposomes et par conséquent évitent leur éclatement par turgescence [Barenholtz, 2001].

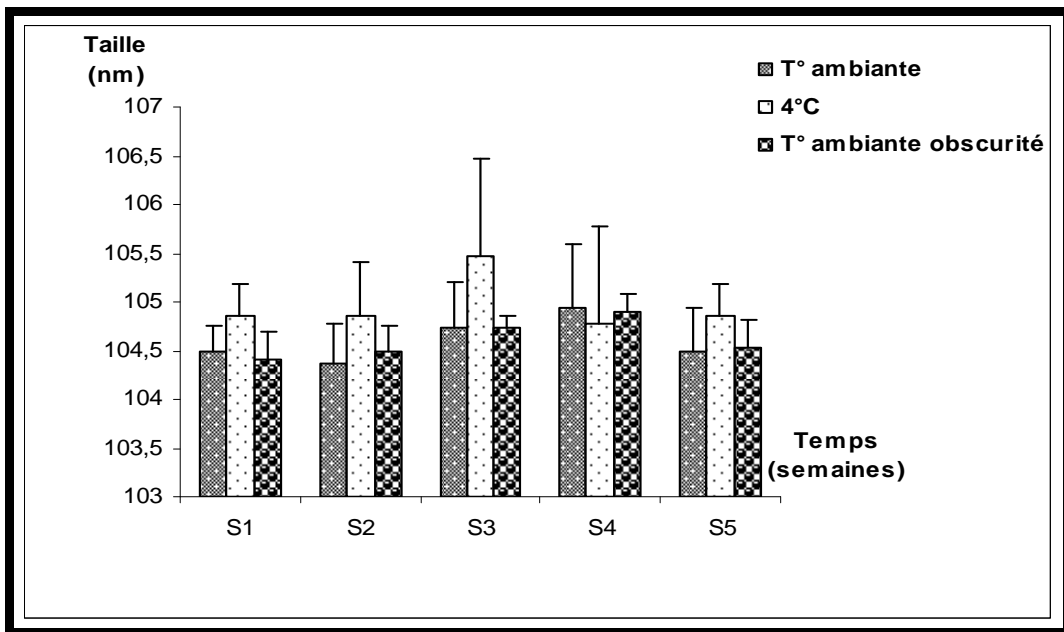


Fig.26: Etude de la stabilité des liposomes vides en fonction du temps et sous différentes conditions ($p > 0.05$).

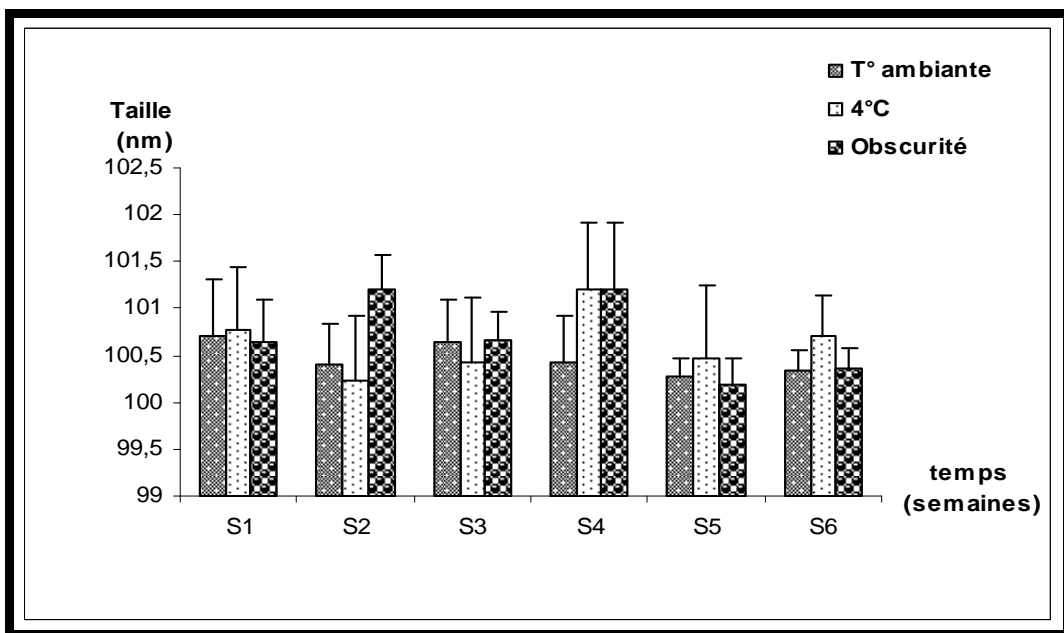


Fig.27: Etude de la stabilité des liposomes chargés en fonction du temps et sous différentes conditions ($p > 0.05$).

4. Microscopie électronique

La figure 28 montre les microphotographies prises en microscopie électronique à transmission de liposomes vides ou contenant de la doxorubicine après coloration négative.

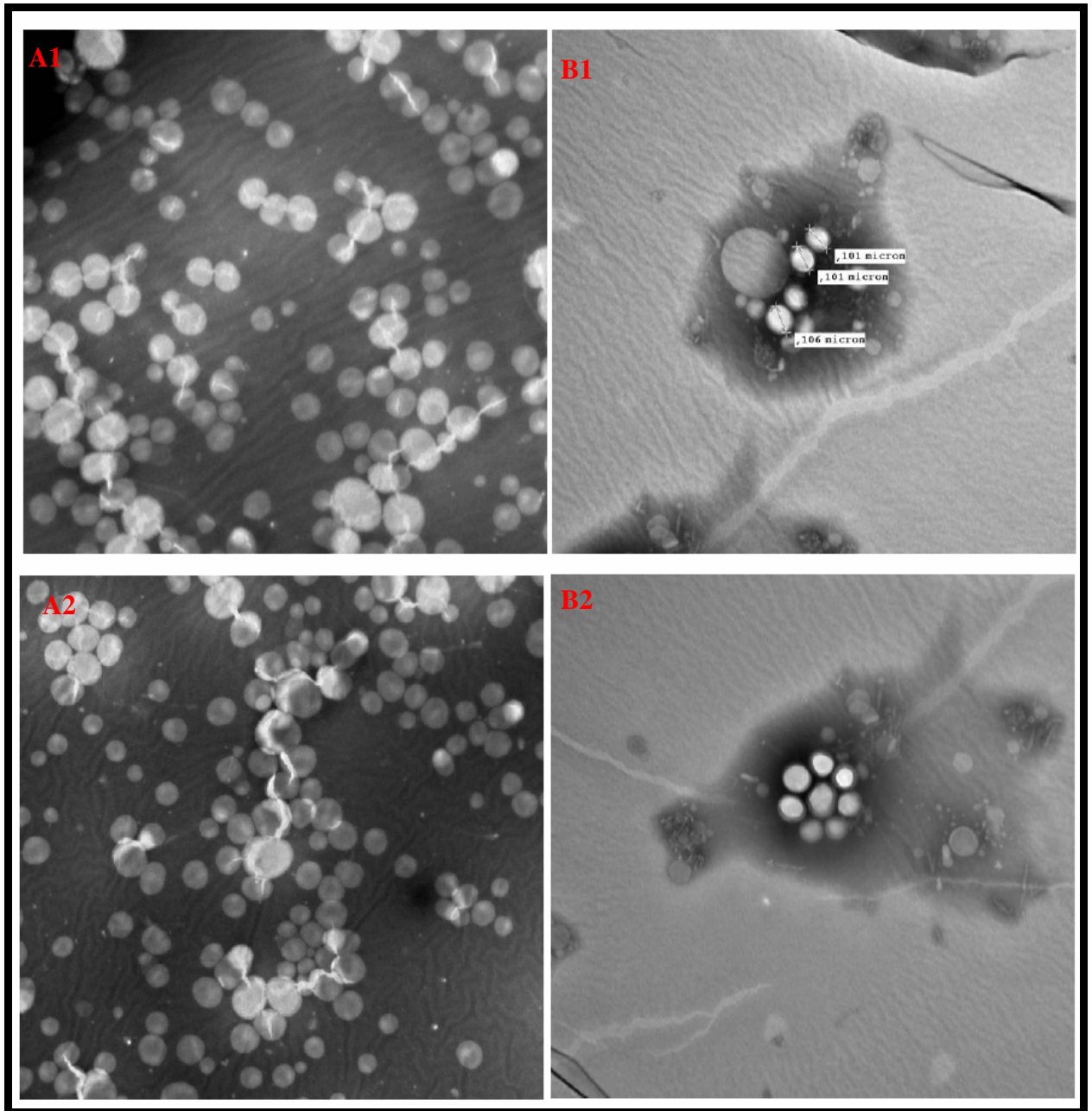


Fig.28: microphotographies prises au microscope électronique à transmission de liposomes vides (A1 et A2) et chargés en doxorubicine (B1 et B2) après coloration négative avec du phosphotungstate 1%.

La micrographie révèle des liposomes préparés avec une solution de réhydratation de sulfate d'ammonium (250mM, pH 5.4) et dont la phase externe a été remplacée par du PBS pH8 afin de générer un gradient de pH transmembranaire (phase interne acide, phase externe basique).

Les liposomes vides apparaissent ayant un cœur terne alors que les liposomes avec doxorubicine (rapport doxo/lipides 1/20w/w) ont un cœur brillant du à la présence de doxorubicine [Abraham et al., 2002]; on note la coexistence de liposomes vides et chargés.

Les liposomes vides et chargés apparaissent généralement de forme plus au moins sphériques et uniformes avec un diamètre apparent variant entre 80 et 100nm; valeur en harmonie avec la grandeur déterminée par DLS. Cependant, le TEM à aussi permet de visualiser des liposomes de taille différentes que celle rapportée par la DLS (Figure 29).

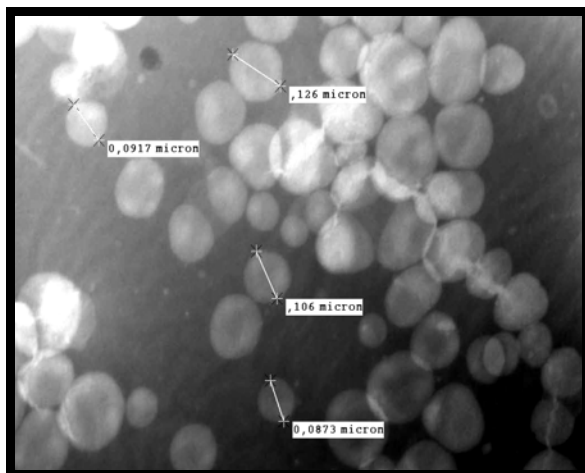


Fig.29: microphotographie prise au microscope électronique à transmission de liposomes vides après coloration négative avec du phosphotungstate 1%.

L'existence de petits et de grands liposomes observés proviendrait probablement de la rupture et de la fusion des liposomes respectivement après leur adsorption à la surface du film de carbone étalé sur les grilles utilisées pour la micrographie. Ceci permet de comprendre que la DLS n'a pas pu mettre ces deux catégories de liposomes, absent en solution et se forment après adsorption.

C. Etude in vitro

1. Viabilité cellulaire (Test MTT et test LDH)

Le test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl - tetrazolium bromide), test communément utilisé *in vitro* pour mesurer le nombre de cellules métaboliquement actives, a été utilisé comme index pour évaluer la viabilité cellulaire et mitochondriale autrement dit la cytotoxicité de la doxorubicine. Le test est basé sur la conversion du MTT, composé de coloration jaune soluble dans l'eau, par les déshydrogénases mitochondriales en cristaux de coloration pourpre (sel de formazan) insolubles dans l'eau. La quantité de formazan formé est proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives [Mossman, 1983].

L'exposition de cellules H9c2 à des doses croissantes de doxorubicine (1 μ M à 100 μ M) avait pour résultat une toxicité temps et dose dépendante (Figure 30) confortant des résultats rapportés par différents auteurs [Youn el al., 2005 ; Bernuzzi et al., 2009].

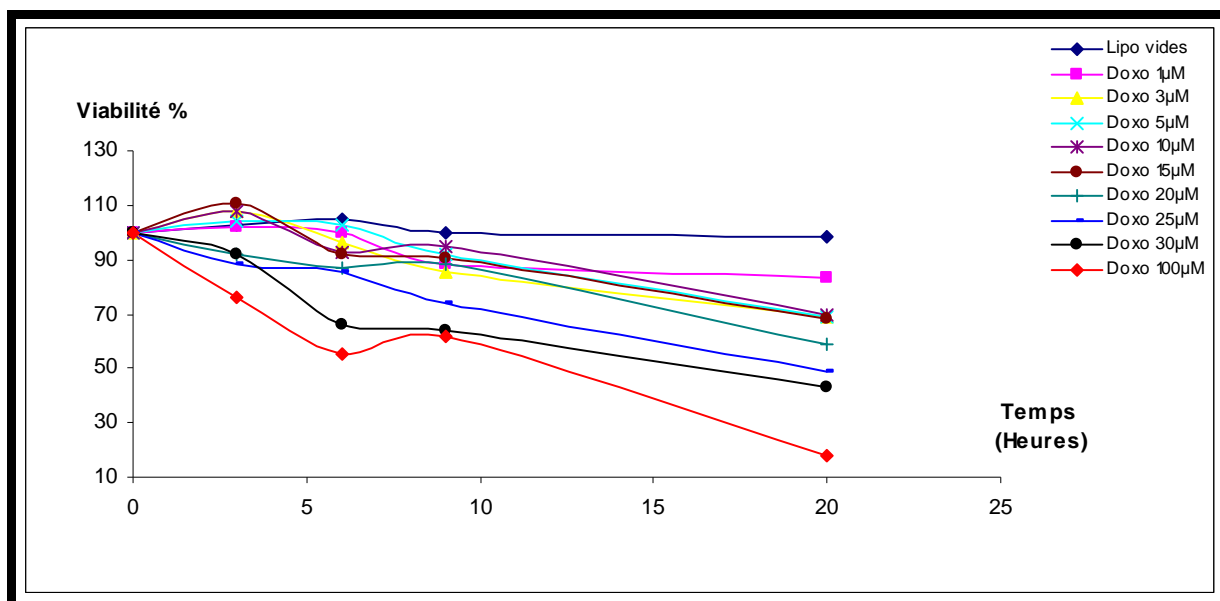


Fig.30: Effet de différentes doses de doxorubicine sur la viabilité des cellules cardiaques de rat H9c2.

La réduction de la viabilité cellulaire ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial n'étaient décelables qu'à partir de la 9h pour les doses de 1 à 20µM, et à partir de 3h pour les doses de 25µM, 30 et 100µM ($p < 0.001$).

Les essais de MTT ont montré que pour les faibles doses (entre 1 et 20µM), une incubation des cellules cardiaques H9c2 pendant des temps allant de 3 à 9h n'entraîne aucune réduction significative de la viabilité (réduction de viabilité varie de 0 à 12%) malgré que l'analyse au cours du temps des données a révélé que la conversion MTT en formazan commence dès 3h d'incubation dans quelques expériences mais cette réduction était inférieure à celle de 6h et ainsi de suite (tableau 1, voir annexe), ceci montre que la toxicité débute précocement.

Pour les hautes concentrations de doxorubicine (25, 30 et 100µM), la réduction de la viabilité était significative ($p < 0.001$) à partir de 3h d'incubation avec une réduction de viabilité variant de 8 à 24%.

La plus grande réduction de la fonction de mitochondriale a été vue avec toutes les concentrations testées après 20h d'incubation (Figure 31 et 32). Les doses allant de 1 à 20µM ont réduit la conversion MTT entre 17 à 42%.

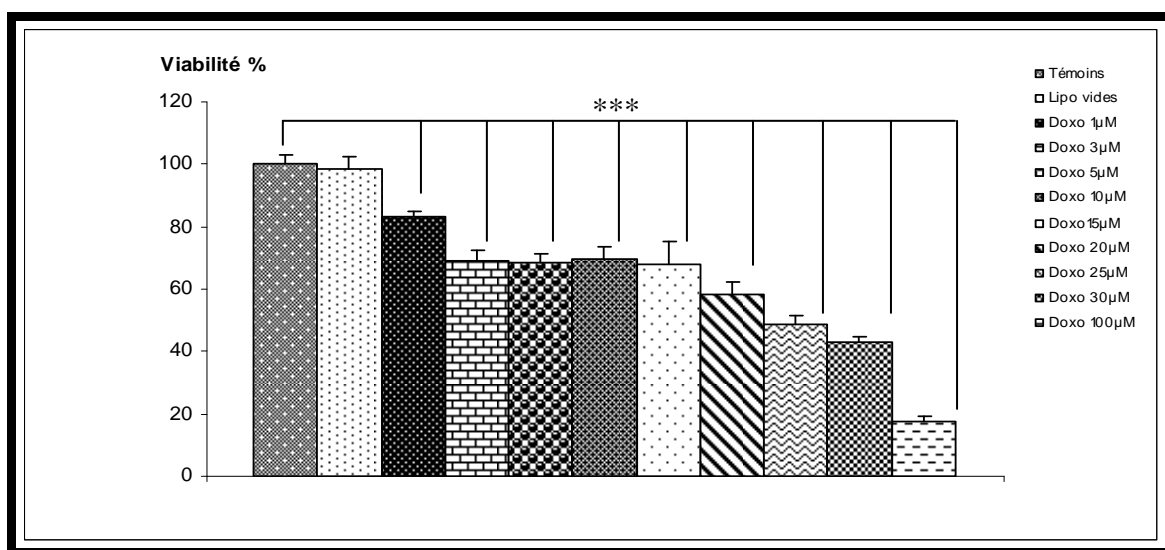


Fig.31: Effet de la doxorubicine sur la viabilité de cellules cardiaques de rats H9c2 après 20h d'incubation ($p < 0.001$).

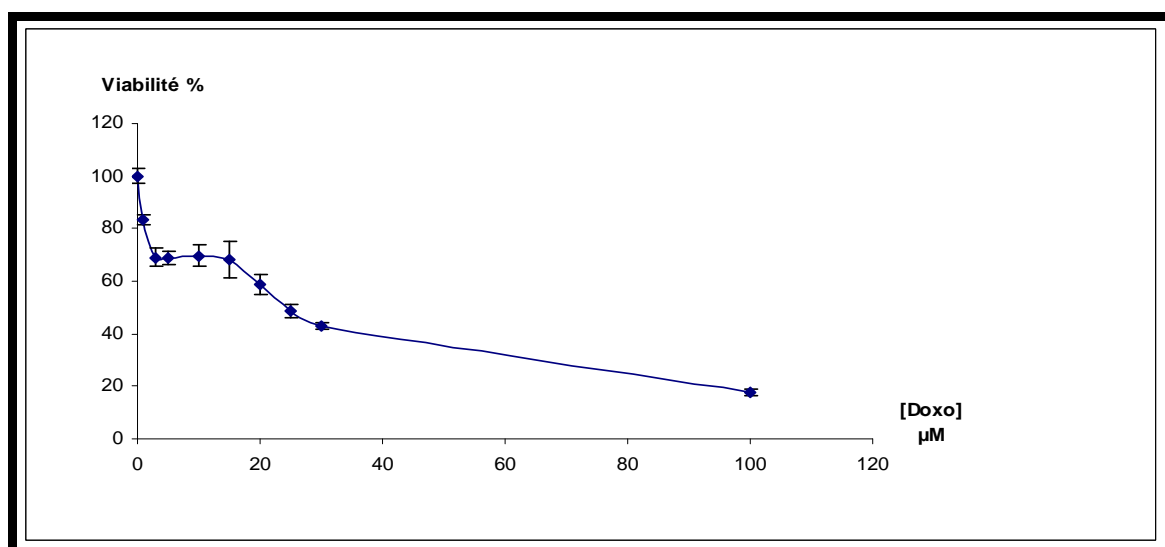


Fig. 32: Effet de la doxorubicine sur la viabilité de cellules cardiaques de rats H9c2 après 20h d'incubation.

Pour les doses allant de 25 à 100 la réduction variée entre 58 et 83%; ceci correspondu à un déclin très significatif dans la viabilité de cellules ($p < 0.001$), suggérant que ces doses avec le temps ont provoqué non pas seulement des dommages aux mitochondries, mais peuvent aussi inciter une apoptose ou une nécrose.

La DL₅₀ de la doxorubicine pour les cellules H9c2 après 20h d'incubation était de 25μM.

La libération de l'enzyme cytosolique LDH, communément utilisé pour évaluer les altérations induites par les médicaments et comme indicateur de mort par nécrose [Bernuzzi et al., 2009] a été estimée. Après 3h d'incubation, on note l'absence de libération de LDH cytosolique au niveau des cellules exposées à des doses allant de 10 à 30 μM de doxorubicine alors que pour celles exposées à

la dose de 100µM on note une libération de 13% ($p < 0.001$) (Figure 33). Pour les faibles doses de doxorubicine (1, 3, 5µM), la libération de LDH était absente quelque soit le temps d'incubation (3, 6, 9 et 20h) (Figure 34).

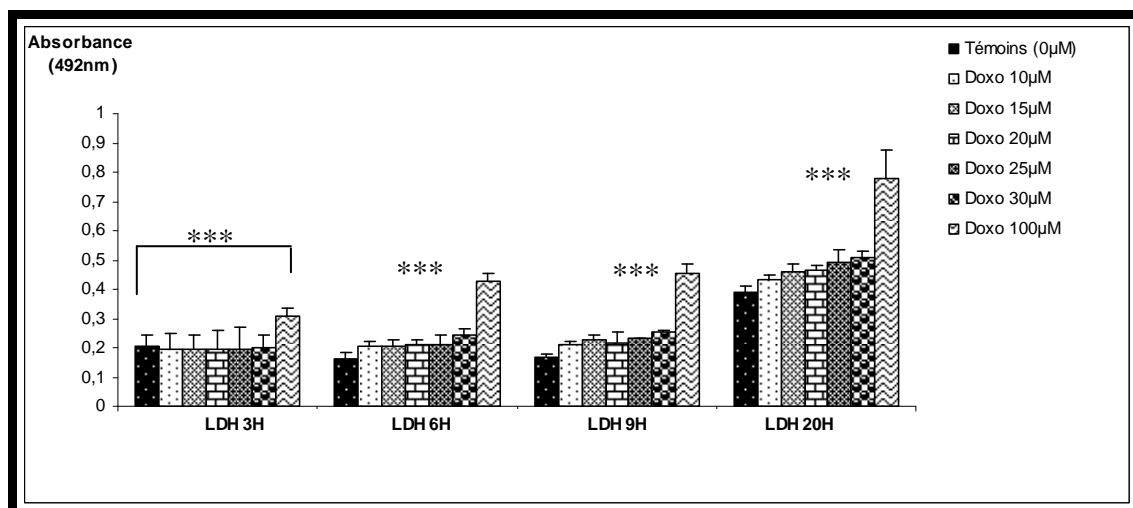


Fig. 33: Effet de la doxorubicine sur la viabilité des cellules H9c2 en fonction du temps et de la concentration de doxorubicine ($p < 0.001$).

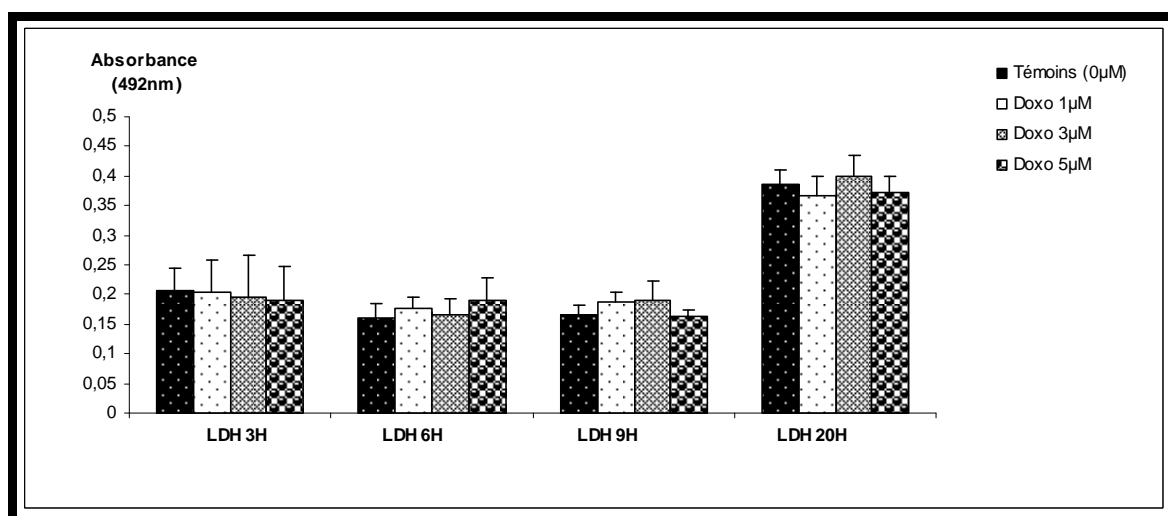


Fig.34: Effet de la doxorubicine sur la viabilité des cellules H9c2 en fonction du temps et de la concentration de doxorubicine ($p > 0.05$).

Une libération est notée pour les doses allant de 10 à 30µM et allant de 4 à 9% après 6h d'incubation ($p < 0.001$) et de 5 à 10% après 9h ($p < 0.001$) et de 6 à 15% après 20h d'incubation ($p < 0.001$) avec de la doxorubicine (Figure 33). Pour la dose de 100µM, cette libération est passée de 13% après 3h d'incubation à 50% après 20h d'incubation ($p < 0.001$).

D'une part, ces résultats laisse suggérer que la nécrose est la forme de mort cellulaire qui prévaut dans les cellules H9c2 exposées à des doses élevées de doxorubicine alors que pour les faibles doses,

où on note l'existence de toxicité latente révélée par le test MTT (Figure 35), l'apoptose serait la forme de mort cellulaire qui prévaut.

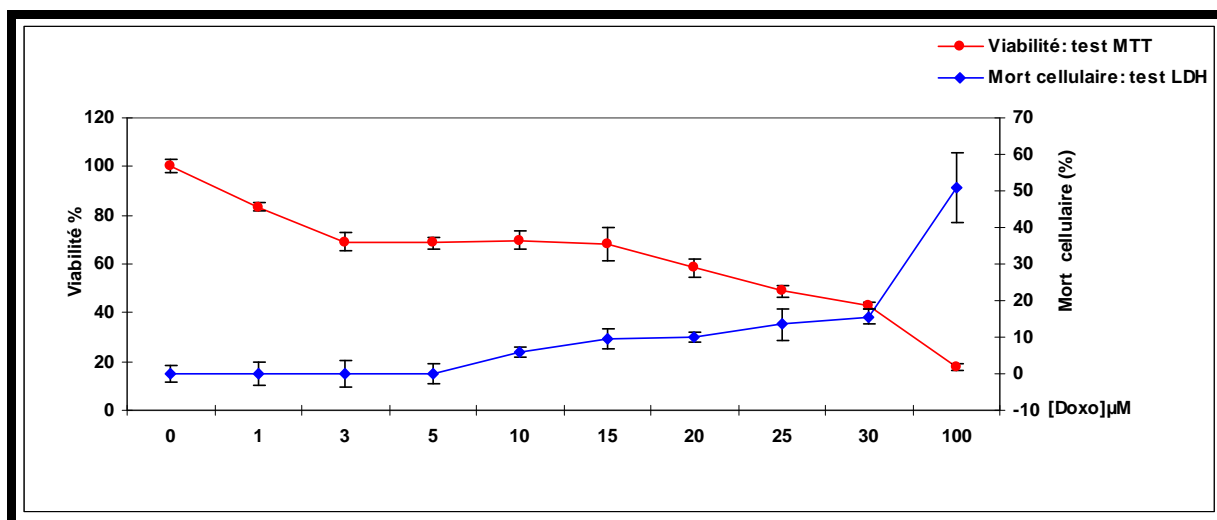


Fig.35: Viabilité des cellules H9c2 exposées à des doses croissantes de doxorubicine après 20h d'incubation.

D'autre part, avec le test LDH, les effets toxiques de la doxorubicine n'étaient détectables et avec un effet significatif qu'à partir de la 6h sauf pour la dose de 100µM (3h). Donc, la différence au cours de temps de ces marqueurs de viabilité (Figure 35) indique que le dysfonctionnement mitochondrial (test MTT) est un événement précoce de la toxicité exercée par la doxorubicine dans ces cellules avant la mort de la cellule. Cette précocité serait due au fait que la membrane mitochondriale est plus sujette à la peroxydation lipidique que les autres membranes, ceci est dû à : (a) la génération de ROS à lieu essentiellement dans la membrane mitochondriale externe plutôt que dans les autres compartiments cytoplasmique de la cellule; (b) richesse de la membrane mitochondriale interne en phospholipides comportant des résidus d'acides gras insaturés ; (c) l'affinité élevée de la doxorubicine et des autres anthracyclines pour les cardiolipides, qui constituent 18 % de la membrane mitochondriale interne [Jung et Reszka, 2001].

2. Analyse de la capture de la doxorubicine libre et encapsulée par les cellules

L'analyse par cytométrie des cellules nous a permis de tracer 2 types d'histogrammes pour chaque échantillon. Le premier appelé histogramme biparamétrique, permet de visualiser les cellules sur leurs caractéristiques de taille (FSC) et de granulométrie (SSC). Le second nommé histogramme monoparamétrique de fluorescence représente le nombre d'événements en fonction de l'intensité de la fluorescence (FL2), permet de visualiser la fluorescence relevée pour l'ensemble de la population jugée pertinente.

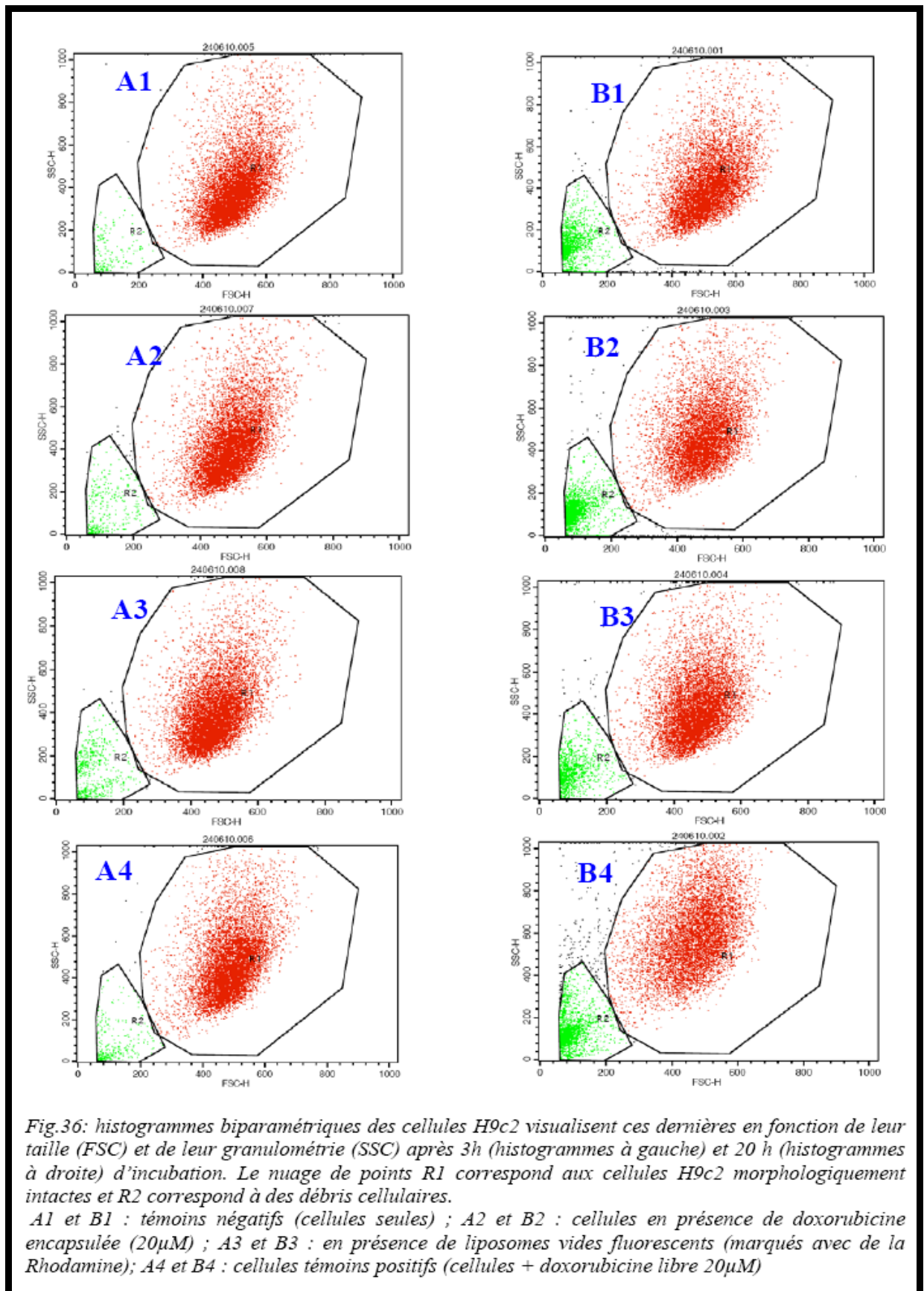
Sur les histogrammes FS/SS (Figure 36), chaque point correspond à un événement c'est-à-dire à une particule individualisée passée devant le laser (cellule, agrégat de principe actif, débris cellulaire...). Ces points s'accumulent et forment deux nuages de points disjoints définissant deux sous-populations différentes, la première R1 qui correspond à des cellules H9c2 morphologiquement intactes et R2 semble plutôt correspondre à des débris cellulaires. En effet, la prise en compte des deux paramètres (FSC et SSC) permet d'identifier et d'éliminer de l'étude les événements artéfactuels comme les débris cellulaires ou les agrégats [Métézeau et Vielh, 2001].

La proportion de la population R1 est la plus importante, elle représente 94,2% à 97,83% des événements après 3h et 75,05% à 87,01% après 20h d'incubation alors que la population R2 est la plus faible en proportion ne représente qu'entre 1.86% (après 3 heures d'incubation) à 23.25% (après 20 heures d'incubation) de la population totale et ceci quelque soit la formulation utilisée (doxorubicine libre, liposomale et liposomes vides).

Il est ensuite possible d'analyser les populations grâce à leur fluorescence. C'est ce que nous montrent les histogrammes monoparamétriques (Figure 37). Ces graphiques présentent en abscisse l'intensité de fluorescence et en ordonné le nombre de cellules ayant ce niveau de fluorescence. Dans la Figure 2, simplement la région R1 (cellules intactes) est analysée. Dans chacun des cas où la doxorubicine a été mise en présence, que ce soit encapsulée ou sous forme libre, avec les cellules, on constate que l'intensité que ce soit encapsulée ou sous forme libre, avec les cellules, on constate que l'intensité de la fluorescence était plus importante par rapport aux témoins négatifs (Figure 37: A1 et B1) et est donc la preuve que la doxorubicine a été associée avec les cellules. En effet, dans R1, presque toutes les cellules sont dans la zone M3, tandis que si l'on compare avec le témoin sans formulation, il y a très peu de cellules qui dépassent M1, et aucune qui dépasse M3. Ainsi, la fluorescence dans les échantillons traités vient bien des formulations ajoutées car elle dépasse l'autofluorescence des cellules observée dans le témoin.

En outre, la doxorubicine libre a affichée une plus haute association cellulaire de doxorubicine (Figure 37 : A4 et B4) que la forme liposomale (Figure 37: A2 et B2) affiche une association moins importante mais toujours significative.

Cependant, l'étude de l'effet du temps d'incubation sur la capture de la doxorubicine montre que l'intensité de la fluorescence après 20h d'incubation était plus importante qu'après 3h mais la proportion des cellules ayant capturées la doxorubicine était plus important après 3h (Figure 37: A1, A2, A3, A4) qu'après 20h (Figure 37: B1, B2, B3, B4) ceci s'expliquerait par l'éventuelle perte de cellules cardiaques, étant donné que la proportion de la population R2 (débris cellulaires) a augmenté: elle est passée de 2% (après 3h d'incubation) à 23% (après 20h d'incubation) (voir annexe).



L'étude des histogrammes obtenus pour les liposomes fluorescents (Figure 37: A3 et B3) nous indiquent qu'il y a bien association de ceux-ci avec la cellule étant donné qu'on constate une translation du pic de fluorescence vers des valeurs plus élevées en fonction du temps d'incubation.

En outre, si on compare ces cellules traitées par des liposomes vides fluorescents avec les témoins négatifs, on observe qu'ils affichent presque la même intensité de fluorescence après 3h d'incubation ce qui suggère que les liposomes vides s'associent lentement avec les cellules ; la présence de PEG à la surface des liposomes peut être responsable d'une telle lenteur d'association.

Cependant, après 20h d'incubation, le niveau de fluorescence des cellules traités par les liposomes vides été de deux fois plus important que celui des témoins négatifs. Cette différence de fluorescence s'expliquerait par l'éventuelle endocytose des liposomes.

Ainsi, la doxorubicine encapsulée dans les liposomes pourrait entrer dans les cellules soit par simple diffusion, soit par endocytose. Ceci permet d'expliquer le taux intracellulaire plus élevé du médicament sous forme libre par rapport à la forme liposomale, faible fluorescence des cellules incubées avec la forme liposomale (Figure 37: A2 et B2) par rapport à la forme libre (Figure 37: A4 et B4) [Xiong et al., 2005]. En effet, le caractère neutre de la molécule de doxorubicine au pH physiologique [Fenske et Cullis, 2007] entraîne une diffusion rapide du médicament vers l'intérieur des cellules, alors que sous forme liposomale, le phénomène d'endocytose nécessite plus de temps.

Cependant, plus d'expériences sont nécessaires pour distinguer entre la partie de la doxorubicine encapsulé qui rentre dans la cellule par endocytose des liposomes intacts et la partie qui est d'abord libérée des liposomes et rentre dans les cellules par diffusion

L'utilisation de la microscopie de fluorescence nous a permis aussi de visualiser l'association de la doxorubicine encapsulée ou libre avec les cellules.

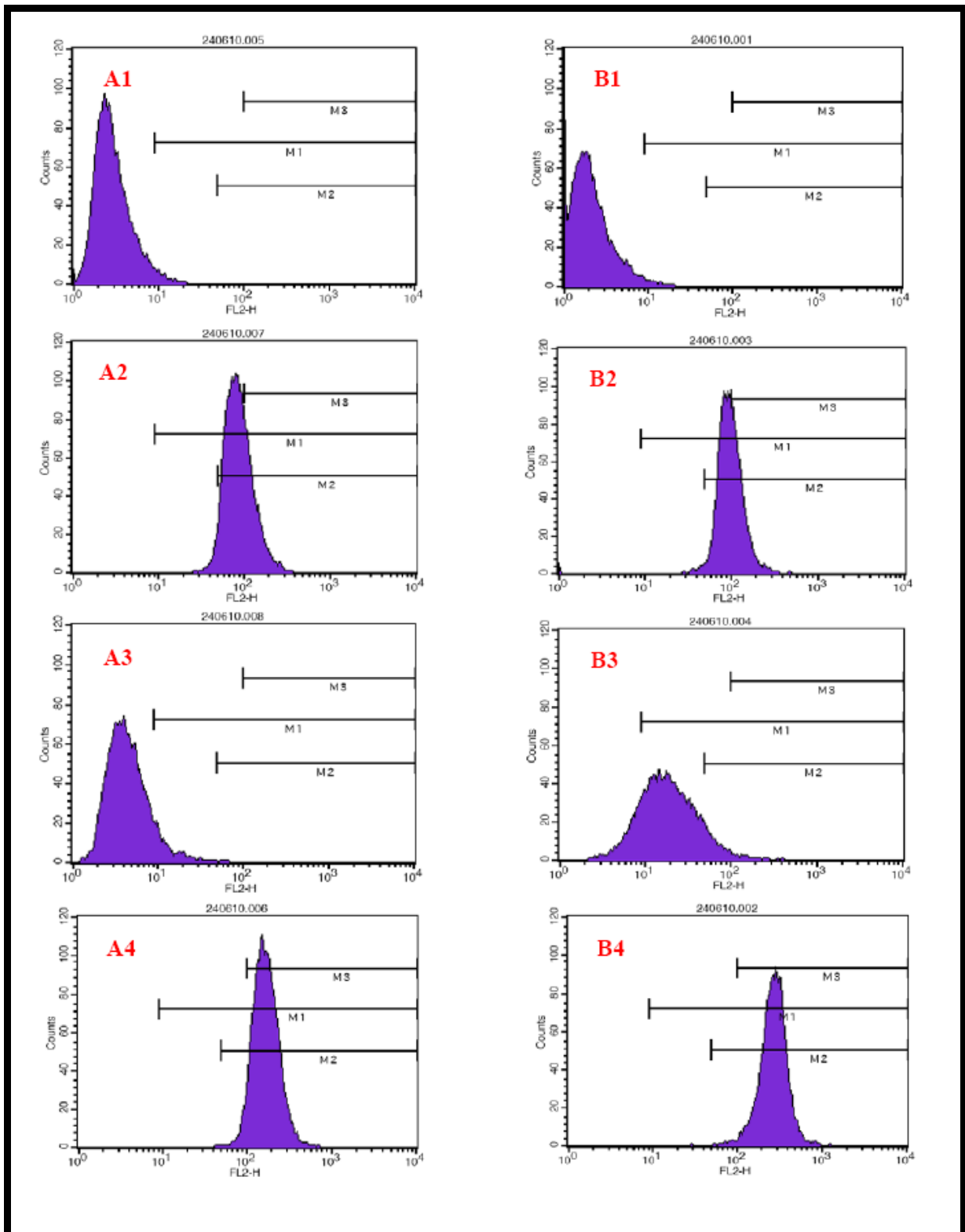


Fig. 37 : Analyse monoparamétrique de la fluorescence (FL2) après 3 heures (à gauche) et 20 heures (à droite) d'incubation des cellules H9c2 avec différentes formulations. Les histogrammes montrent le pourcentage d'évènements ou de cellules de la population R1 ayant captés la les formes testées par rapport à un témoin négatif.

A1 et B1 : témoins négatifs (cellules seules) ; A2 et B2 : cellules en présence de doxorubicine encapsulée (20 μ M) ; A3 et B3 : en présence de liposomes vides fluorescents (marqués avec de la Rhodamine) ; A4 et B4 : cellules témoins positifs (cellules + doxorubicine libre 20 μ M)

Figure 38 montrent les cellules H9c2 après 20h d'incubation en présence de doxorubicine libre ou encapsulé. La fluorescence de la doxorubicine est principalement dans le compartiment périnucléaire, alors que le cytoplasme affiche une faible intensité de fluorescence ; résultat similaire à celui d'autres auteurs [Xiong et al., 2005]. Ainsi, la distribution de la fluorescence autour du noyau suggère fortement l'internalisation.

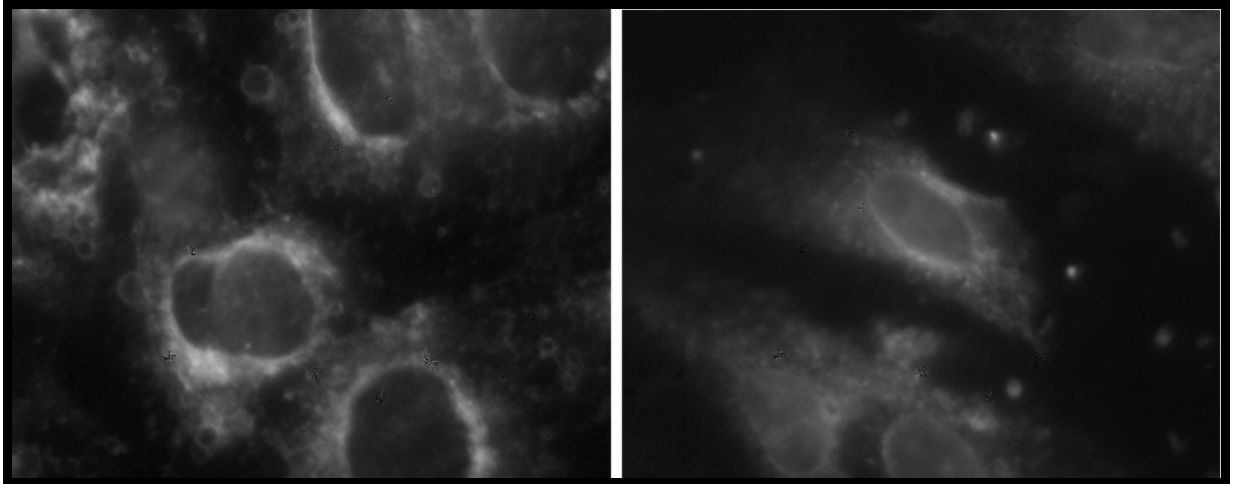


Fig.38: microphotographies représentant des cellules H9c2 en interaction avec de la doxorubicine libre (à gauche) ou avec des liposomes chargés en doxorubicine (à droite) après 20 heures d'incubation.

Cependant, la fluorescence de la doxorubicine était plus intense chez les cellules traitées avec de la doxorubicine libre que ceux ayant reçus la forme liposomale, indiquant une diffusion importante et rapide de la doxorubicine libre dans ces cellules alors que l'endocytose des liposomes chargés nécessite plus de temps.

La distribution périnucléaire de la doxorubicine autour du noyau est due à la très grande affinité de ce médicament pour l'ADN [Cutts et Phillips, 1995].

Des observations des cellules traitées avec les liposomes marqués à la rhodamine ont également démontré une fluorescence dans le cytoplasme des cellules, ce qui laisse supposer que des liposomes peuvent être internalisés (résultats non démontrés).

D. Etude in vivo

L'utilisation des anthracyclines dans le traitement des tumeurs malignes est limitée par leur cardiotoxicité dose-dépendante. Les effets chroniques de cette toxicité surviennent plusieurs semaines ou mois après l'administration de l'anthracycline. Ils se traduisent par une insuffisance cardiaque sévère, liée la dose cumulative administrée, et mortelle dans plus de 60% des cas.

Différentes études chez l'animal ont essayé de comprendre la physiopathologie de cette cardiomyopathie, en utilisant le plus souvent un modèle comportant des injections itératives de

doxorubicine. Nous avons choisi au contraire l'emploi d'une dose unique plus importante afin d'avoir une toxicité aigue au lieu de chronique.

Au cours de notre étude, sur l'effet de l'administration intrapéritonéale d'une dose aigue de doxorubicine (30mg/kg), la survie était de 100% aussi bien au sein du groupe de rats témoins que du groupe traité.

1. Effet de la doxorubicine sur le poids du cœur et le poids corporel

Le poids du cœur est mesuré le jour de l'euthanasie des animaux, c'est-à-dire, le lendemain du traitement des animaux. Le poids corporel est estimé avant et après l'injection IP de doxorubicine.

1.1. Evolution pondérale

L'évolution pondérale est caractérisée par une réduction du gain pondéral chez les rats traités par la doxorubicine. Le jour du sacrifice, la valeur moyenne du poids corporel des rats traités (Figure 39) était de 213 ± 13 g, poids moyen après l'injection de doxorubicine, contre 253 ± 12 g, poids moyen avant l'injection de doxorubicine ($p < 0.01$), ceci s'expliquerait par une éventuelle anorexie chez les animaux (Figure 40).

Chez les rats témoins, et ceux recevant des liposomes vides (Figure 39), les valeurs moyennes du poids corporel étaient $232,308 \pm 15,342$ g et $264,25 \pm 11,021$ g respectivement contre $225,75 \pm 15,342$ g et $256 \pm 9,364$ g, valeur moyenne avant le traitement ($p < 0.001$), montrant que l'appétit des rats n'a pas été affectée par l'administration de NaCl 0.9% et de liposomes vides (Figure 40).

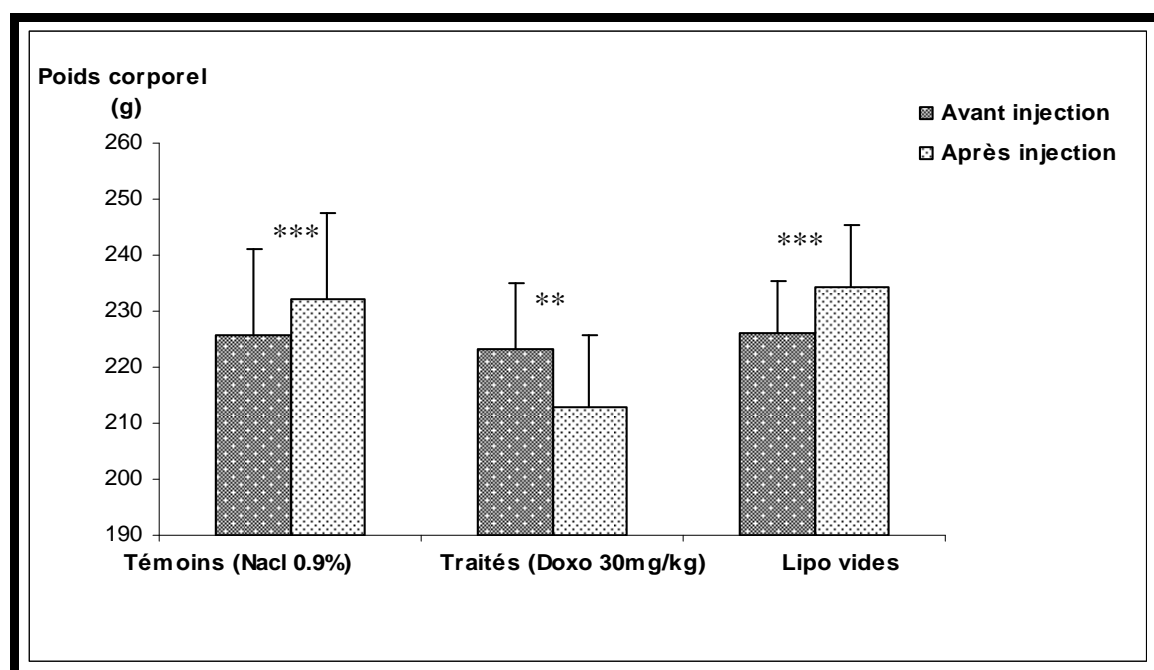


Fig.39: Effet de la doxorubicine sur le poids corporel (Témoins $p < 0.001$; Doxo $p < 0.01$, Lipo vides $p < 0.001$).

En moyenne, la diminution du poids corporel des rats traités était de 253,33–212,833 soit 40 à 49g plus basse qu'avant l'injection de la doxorubicine. Cette valeur positive signifie que le traitement tend à diminuer le poids corporel, i.e., entraîne un retard de croissance. De même, chez les témoins et les animaux recevant des liposomes vides, la différence est de 225,75–232.308 et 256–264,25 soit -6.558g et -8,25g respectivement. La valeur petite et négative signifierait que la l'administration du NaCl 0.9% et de liposomes vides n'entraînent pas un retarde de la croissance des animaux (lipides non toxiques).

Nous avons défini la différence en soustrayant la moyenne du poids avant l'injection du traitement considéré de la moyenne du poids après injection. Nos résultats confortent les données trouvées dans la littérature et stipulant que l'administration d'une dose aiguë ou chronique de la doxorubicine entraîne une diminution du poids des animaux [Zhou et al., 2001a ; Oliveira et Wallace, 2006; Koti et al., 2008].

De plus la mesure de la nourriture avant et après chaque traitement (Figure 40) montre une diminution de la prise alimentaire chez les rats ayant reçus une dose aiguë de doxorubicine alors que chez les rats ayant reçus du NaCl ou des liposomes vides, la prise alimentaire n'a pas diminué.

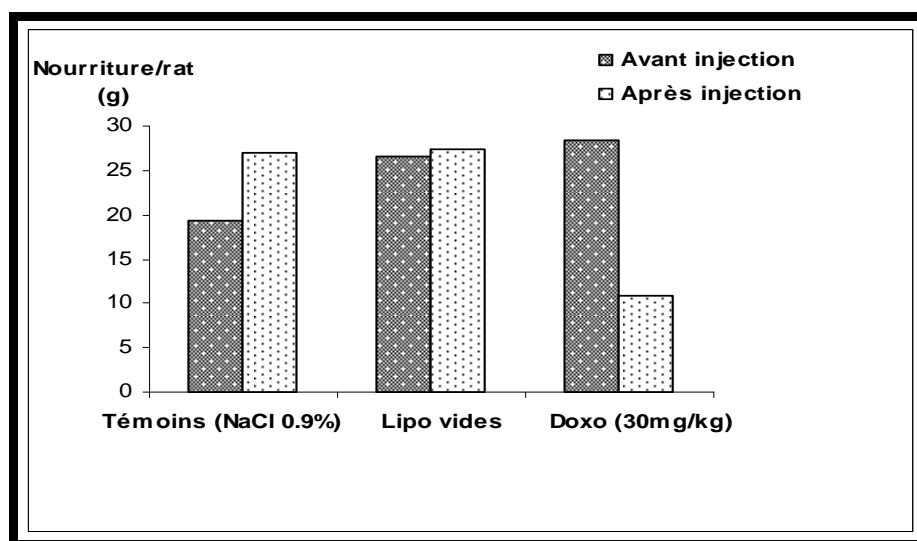


Fig.40: Effet de la doxorubicine (30mg/kg) sur la prise alimentaire.

1.2. Poids du cœur

La valeur moyenne du poids du cœur était de $0,739 \pm 0,07g$, pour les rats traités par une dose aiguë de doxorubicine, contre une valeur de $0,744 \pm 0,039g$ et $0,804 \pm 0,037g$ pour les rats témoins et ceux ayant reçus des liposomes vides respectivement (Figure 41).

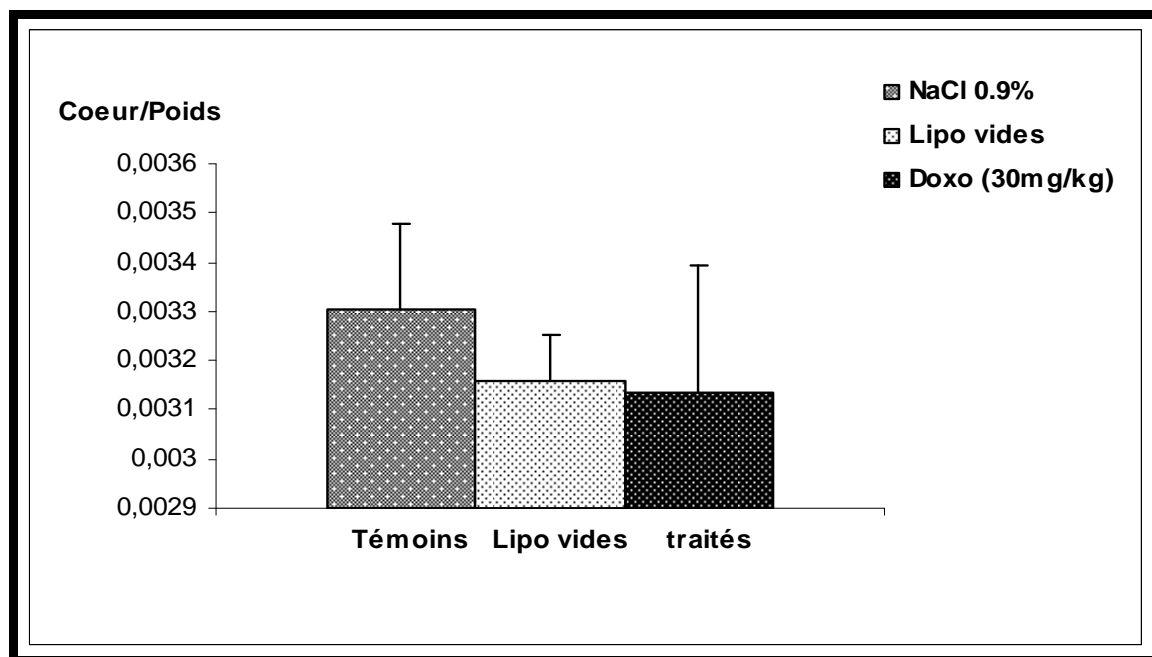


Fig.41: Effet de la doxorubicine sur le poids du cœur 24h après l'administration IP d'une dose de 30mg/kg ($p>0.05$).

En moyenne, la diminution du poids du cœur des rats traités était de 0,739–0,744 et 0,739-0,804 soit -0,005g et 0,065g plus basse que celle du lot de rats témoins et des rats traités avec des liposomes vides respectivement contrôles ou une différence de 4.9%. La valeur négative signifie que l'administration d'une dose aiguë de doxorubicine tend à diminuer le poids cœur. Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative ($p>0.05$). Une diminution du poids du cœur chez des rats traités par la doxorubicine a été signalés par d'autres chercheurs [Zhou et al., 2001a ; Oliveira et Wallace, 2006] alors que d'autres auteurs [Koti et al., 2008] rapportent une augmentation du poids de cet organe.

Afin d'ajuster la mesure à la corpulence, nous avons divisé le poids du cœur par le poids corporel. Les données montrent aussi l'absence de différence significative, résultat corroborant le travail de [Zhou et al., 2001a].

2. Evaluation de l'effet de ROS sur le cœur

2.1. Peroxydation lipidique

Ils existent de nombreux marqueurs de la peroxydation lipidique dont le dialdéhyde malonique (MDA) qui est sans doute le plus connu et le plus utilisé. Il résulte de la dégradation des hydroperoxydes formés au cours de la peroxydation des acides gras polyinsaturés [Guichardant et al., 2006]. La quantification du taux de ce dernier est généralement acceptée comme indicateur du stress oxydatif résultant d'une surproduction de ROS et de la diminution des défenses anti-oxydantes.

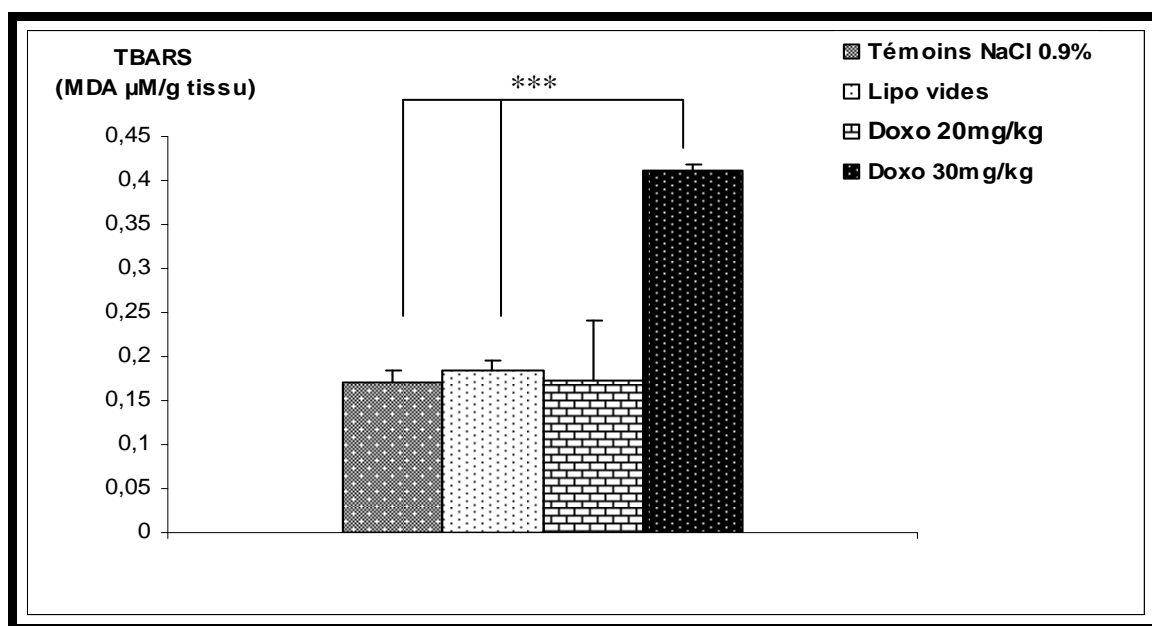


Fig.42: Effet de la doxorubicine sur le taux de TBARS (Doxo-Témoins $p < 0.001$; Doxo-Lipo $p < 0.001$; Lipo-Témoins $p > 0.05$). Alors que $p > 0.05$ lorsque la dose de doxorubicine est e 20mg/kg.

Nos résultats (Figure 42) montrent une augmentation du taux de TBARS chez les rats traités avec une dose aiguë de doxorubicine (30 mg/kg) par rapport aux rats témoins et ceux recevant une injection de liposomes vides ($p < 0.001$) [Venkatesan, 1998].

En effet, la doxorubicine est responsable de la peroxydation des lipides membranaires (plasmatiques et mitochondriaux) en raison d'une possibilité de liaison privilégiée avec le diphosphatidylglycérol, lipide caractéristique des mitochondries. L'abondance de mitochondries dans le coeur, la richesse de ces dernières en lipides polyinsaturés, jointe à la faible teneur du tissu cardiaque en molécules protectrices des radicaux libres (tocophérol, glutathion-peroxydase, catalase, superoxyde dismutase) expliqueraient la l'augmentation du taux de TBARS dans le tissus cardiaque [Gouttebel, et al., 1996].

Par ailleurs, lors de l'utilisation d'une dose de 20mg/kg de doxrubicine (Figure 42), on a pas observé de différence statistiquement significative ($p > 0.05$).

Cette différence d'effet entre la dose de 30mg/kg et 20mg/kg, s'expliquerait par le fait que la cardiotoxicité induite par la doxorubicine évolue d'une manière biphasique, une phase aiguë et une phase retard, qui sont caractérisées par des anomalies électrophysiologiques (troubles du rythme) et d'une défaillance cardiaque respectivement. La phase aiguë se caractérise par une production précoce de ROS, responsables de la peroxydation des lipides membranaires [Hrelia et al., 2002].

En effet, Luo et al 1997 ont montré que le taux de TBARS dans le plasma et dans l'homogénat de tissus cardiaques de rats traités par la doxorubicine augmente de façon significative après l'administration de doxorubicine. Cette augmentation se produit précocement et culmine 2h après l'administration de la doxorubicine puis le taux de TBRAS décline et revient à la normale dans 8 à

24h. Cette observation est corroboré par les travaux d'autres auteurs [Hrelia et al., 2002 ; Green et Leeuwenburgh, 2002].

Dans notre travail, le taux de TBARS n'était estimé que 24h après l'administration de la doxorubicine ce qui permet d'expliquer l'absence de différence significative entre rats témoins et rats traités lors de l'utilisation de la dose de 20mg/kg.

Durant ce temps (24heures), le retour à la normale du taux de TBARS s'expliquerait par le fait que les produits secondaires issus de l'oxydation des lipides, entre autre le MDA, interagiraient avec d'autres molécules, notamment les protéines, et/ou seraient dégradés en d'autres substances non accessibles au dosage [Eymard, 2003].

D'autre part, en présence de surproduction de ROS, le tissu cardiaque augmente la synthèse de défenses anti-oxydantes tel que le glutathion (voir plus bas), un des cofacteurs des voies de détoxification et de régulation du potentiel redox, ce qui permet de réduire l'effet néfaste des ROS en les inactivant, d'où le faible taux de MDA observé [Chopra et al., 1995], cependant, la mesure de CPK, TGO, TGP chez les rats traités avec une dose de 20mg/kg démontrent la présence d'une atteinte cardiaque.

Pour l'augmentation du taux de TBARS observé avec la dose de 30mg/kgLa doxorubicine est responsable de la peroxydation des lipides membranaires (plasmatiques et mitochondriaux) en raison d'une possibilité de liaison privilégiée avec le diphosphatidylglycérol, lipide caractéristique des mitochondries. L'abondance de mitochondries dans le coeur, la richesse de ces dernières en lipides polyinsaturés, jointe à la faible teneur du tissu cardiaque en molécules protectrices des radicaux libres (tocophérol, glutathion-peroxydase, catalase, superoxyde dismutase) expliqueraient la toxicité de cette molécule pour le coeur.

Enfin, Chopra et al 1995 on montré qu'une dose de doxorubicine de 20mg/kg entraîne une augmentation significative de TBARS par voie intraveineuse et non par voie intrapéritonéale.

2.2. Taux du glutathion

La concentration intracellulaire en glutathion (GSH) est considérée par certains auteurs comme un véritable marqueur de l'état de santé d'un individu [Boutolleau et al., 1997] ; il est le système biologique antioxydant le plus important contre les ROS.

En accord avec la littérature [Venkatesan, 1998 ; Yin et al., 1998 ; Zhou et al., 2001 ; Koti et al., 2008] nous avons constaté une déplétion des réserves cardiaques de GSH ($p < 0.001$) 24h après administration IP de 30mg/kg de doxorubicine (Figure 43) cette diminution est en harmonie avec une production importante de ROS.

Or, ce peptide est l'un des systèmes les plus puissants intervenant dans la détoxification des ROS, en réduisant à la fois le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques. Ainsi, non seulement la

doxorubicine augmente la production de radicaux libres dans le coeur mais elle diminue également ses possibilités de détoxification.

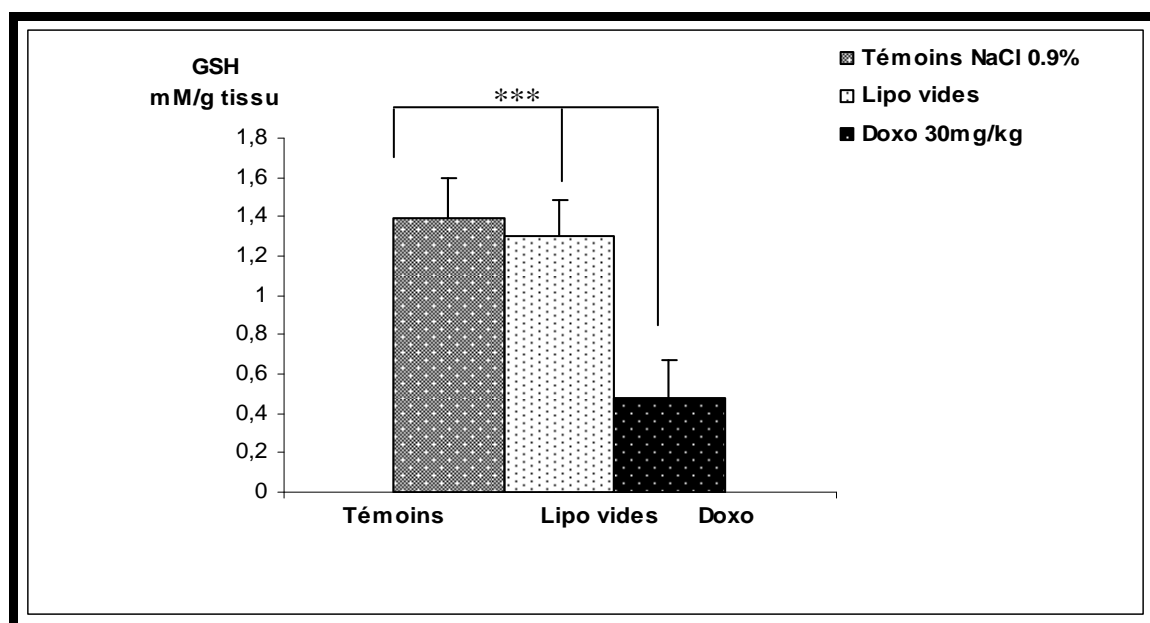


Fig.43: Effet de la doxorubicine sur le taux de glutathion tissulaire cardiaque (Doxo-Témoins $p < 0.001$; Doxo-Lipo $p < 0.01$; Lipo-Témoins $p > 0.05$). Alors que $p > 0.05$ lorsque la dose de doxorubicine est de 20mg/kg.

Par ailleurs, l'administration d'une dose de 20mg/kg de doxorubicine avait pour résultat une élévation de GSH réduit (Figure 43) dans le muscle du coeur par rapport aux rats témoins, augmentation non significative ($p > 0.05$) [Chopra et al., 1995]; observation ratifiée par des travaux antérieurs d'autres auteurs [Luo et al., 1997] rapportant une déplétion précoce du taux de glutathion réduit chez des rats et des souris traités par la doxorubicine, suivie d'une augmentation de taux 24h plus tard. Ainsi, il apparaît qu'un délai de 24h est suffisant pour que le coeur rétablisse ses réserves antioxydantes.

L'absence de différence significative dans le contenu cardiaque de GSH entre témoins et traités pour la dose de 20mg/kg pourrait être due d'une part, à l'intervention compensatrice d'autres systèmes antioxydants en réponse à un stress oxydatif. Par exemple [Yin et al., 1998] rapportent que le tissu cardiaque augmente son contenu en métallothionéine, protéine qui joue un rôle protecteur pour les cellules, ainsi que l'activité de la catalase lors d'un traitement par la doxorubicine. D'autre part, l'augmentation de la consommation enzymatique et non enzymatique du GSH pour la détoxification des ROS générés par la doxorubicine entraîne une élévation dans l'expression du gène codant pour l'enzyme γ -glutamyl-cystéine synthétase d'où une augmentation de l'activité de cet enzyme responsable de la restitution du taux cellulaire du GSH [Yin et al., 1998].

3. Effet de la doxorubicine sur les activités sériques de la CPK et LDH, TGO et TGP

En pathologie, l'augmentation de la destruction cellulaire normale ou cytolyse pathologique des cellules myocardiques entraîne une augmentation de l'activité de certains enzymes dans le plasma est un reflet précoce de lésions myocardiques [Petit, 2004].

La créatine kinase (CK), la lactate déshydrogénase (LDH) et les transaminases (TGO et TGP) font historiquement partie des premières enzymes utilisées chez l'homme dans l'évaluation de la souffrance cardiaque.

Les résultats obtenus ici (Figure 44) traduisent une augmentation significative de l'activité sérique de la créatine kinase cardiaque (Figure 44A, $p < 0.001$), de la lactate déshydrogénase (Figure 44B, $p < 0.01$) et des transaminases TGO et TGP ((Figure 44, $p < 0.001$) chez les rats traités par la doxorubicine par rapport aux rats témoins et aux rats recevant une injection de liposomes vides témoignant ainsi d'une atteinte cardiaque. Ceci s'expliquerait par l'effet délétère qu'exercent les anthracyclines sur toutes les structures de la cellule et particulièrement les membranes (membranes plasmique, mitochondriale et lysosomale) via la peroxydation lipidique secondaire aux ROS générés lors du métabolisme de la doxorubicine [Chopra et al., 1995 ; Venkatesan, 1998 ; Koti et al., 2008] étant donné que l'excès de production de radicaux libres par les antibiotiques de type anthracycline peut dépasser les possibilités de détoxification des cellules myocardiques. Le cœur pourrait donc être particulièrement sensible aux altérations secondaires aux espèces réactives oxygénées induites par les traitements comportant de l'ADM.

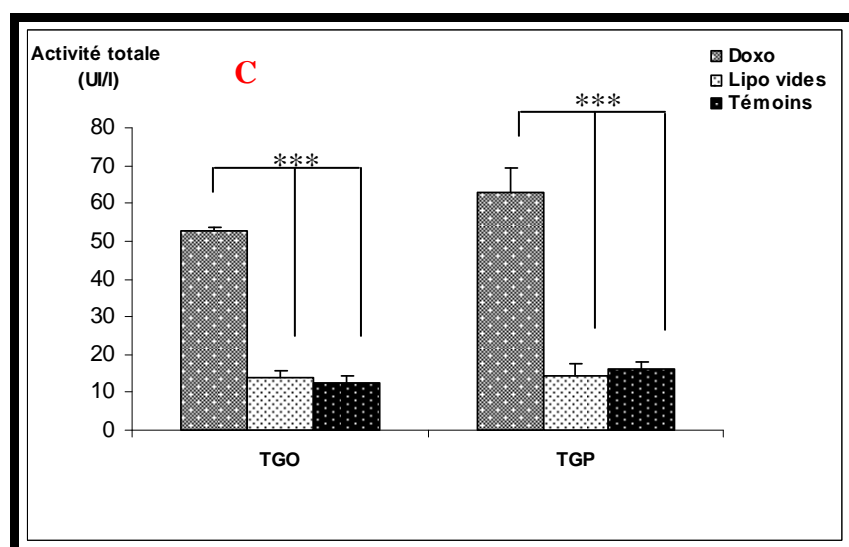
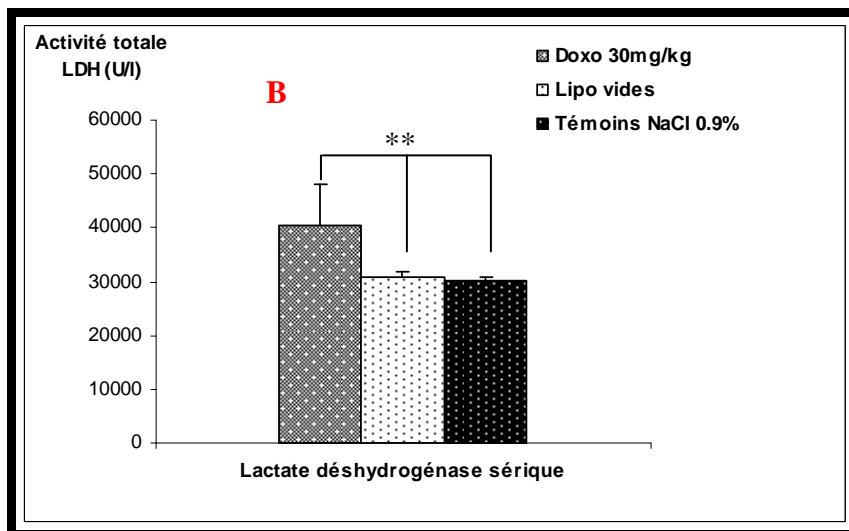
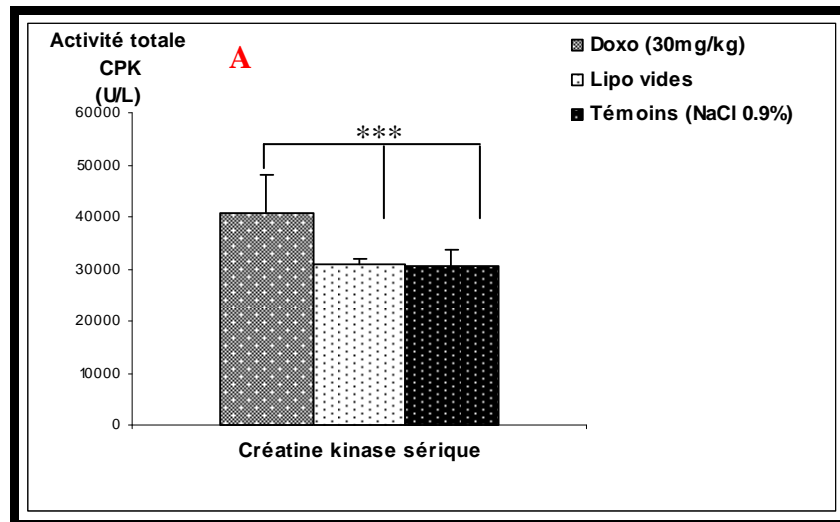


Fig.44 : Effet d'une dose aiguë de 30mg/kg de doxorubicine sur les activités sériques des enzymes CPK, LDH, TGO et TGP.

4. Production de ROS de mitochondries isolées de cœur de rats Wistar

La production de ROS par la chaîne respiratoire de mitochondries, isolées de cœurs de rats Wistar, est déterminée à l'état 2 «pseudo état 4» (sans couplage avec la production d'ATP) de la respiration; étant donné que la production de ROS est plus importante pendant l'état 4 (consommation d'oxygène en absence d'ADP) [Liu et al., 2002]. L'utilisation de la Roténone nous a permis de déterminer l'importance du complexe I dans la production de ROS (Figure 45).

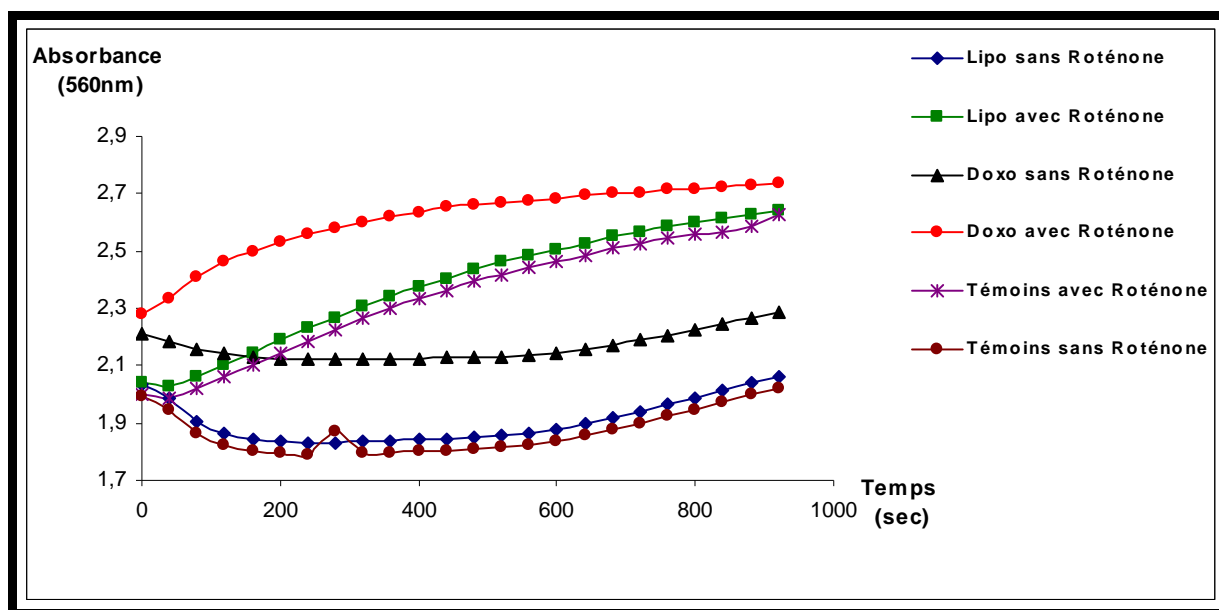


Fig.45: Comparaison de production de ROS de mitochondries isolées de cœur de rats Wistar en présence de succinate comme substrat respiratoire et de roténone

Comme le montre la figure 45, la production de ROS par la chaîne respiratoire de mitochondries isolées du cœur de rats Wistar traités par une doses aiguë de doxorubicine (30mg/kg; I.P.) est plus importante par rapport aux rats témoins ou ceux traités par des liposomes vides ($p < 0.001$). Ainsi, la doxorubicine induit la formation de ROS dans la fraction cellulaire étudiée, ce qui suggère que les lésions cardiaques induites par la ce médicament trouvent leur explication dans la formation de radicaux libres.

La variation dans la production de l'anion superoxyde était rapide aussi bien chez le lot témoin, le lot liposomes vides que le lot traité, mais elle était plus importante chez le lot traité. Ainsi, au temps « $t=0\text{sec}$ », la production d'anion superoxyde est de 2.278 ± 0.047 vs 2.039 ± 0.056 (unités arbitraires) respectivement. Cette production atteint une valeur de 2.5 ± 0.062 au bout de 2,6min chez les rats traités et n'atteint une telle valeur (2.506 ± 0.079) chez les témoins qu'au bout de 10min. Au-delà de la dixième minute, la production d'anion superoxyde reste pratiquement constante avec quelques rebonds. Cette stabilité s'expliquerait par la destruction des mitochondries. En effet ces dernières ne peuvent être conservées plus de 4h après leur isolement à 4°C et dans un tampon approprié (tampon

de lavage). Alors que lors de l'essai, ces conditions ne peuvent être respectées d'où la perte progressive de mitochondries.

L'ajout de Roténone, inhibiteur du complexe I, augmente significativement ($p < 0,001$) la production de ROS par la chaîne respiratoire [Turrens, 1997 ; Grivennikova et Vinogradov, 2006]. Cet effet est plus important chez les rats traités que ceux recevant des liposomes vides ou du NaCl 0.9% (témoins).

Ceci s'expliquerait par le fait que la production initiale d'anion superoxyde se fait essentiellement au niveau du complexe I via un flux « reverse » (montant) d'électrons entre le complexe II et I.

Le flux reverse d'électrons se réfère au phénomène qui en absence d'ADP, les électrons issues de l'oxydation du succinate peuvent s'écouler inversement du complexe II vers le complexe I et réduire le NAD^+ en NADH. *In vivo*, un tel flux reverse est empêché par le flux d'électrons vers le complexe I à partir du coenzyme NADH, sauf dans les conditions pathologiques qui entraînent une déplétion de NADH [Liu et al., 2002].

De plus [Turrens 1997 ; Turrens 2003 ; Vinogradov et Grivennikova, 2005 ; Grivennikova et Vinogradov, 2006] ont montré qu'*in vitro*, les électrons entrant dans la chaîne respiratoire via le complexe II (succinate déshydrogénase) peuvent par un flux reverse vers le complexe I donner des ROS et cette production devient plus importante en présence de roténone (qui bloque l'entrée des équivalents réducteurs via le NADH dans la chaîne respiratoire) ce qui laisse suggérer la NADH déshydrogénase mitochondriale et par conséquent le complexe I (NADH oxydoréductase) est responsable de la réduction monoélectronique de la plupart de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde [Brookes et al., 2004].

D'autre part, la non génération de ROS par le complexe II (succinate deshydrogenase), qui est une flavoprotéine, s'expliquerait par la structure intrinsèque de ce complexe dans laquelle les centres catalysant les réactions d'oxydoréductions sont arrangés de manière à ne pas permettre l'accès de l'oxygène au groupement FAD d'où la non production de ROS [Kowaltowski et al., 2009].

D'autre part, plusieurs auteurs [Staniek et Nohl, 2000 ; Saint-Pierre et al., 2002 ; Liu et al., 2002] rapportent que l'addition de roténone à des mitochondries respirant avec du succinate entraîne l'abolition ou la diminution de la production de ROS, et cette production est plus importante en absence de roténone ; données contredisant nos résultats.

L'effet de la roténone sur le niveau de NADH mitochondrial est complexe. La roténone bloque la formation de NADH secondaire au flux reverse d'électrons, devrait diminuer le niveau de NADH mitochondrial. D'autre part, la roténone (inhibiteur du complexe I) inhibe aussi l'oxydation de NADH par le complexe I. Comme le succinate est converti par le cycle de Krebs en malate avec formation de NADH, l'inhibition du complexe I aura comme conséquence finale une augmentation inéluctable de NADH lorsque succinate est utilisé comme substrat. L'augmentation du taux de coenzymes réduits

(NADH) et l'inhibition du complexe I entraînera un passage direct des électrons du NADH vers l'oxygène moléculaire d'où l'augmentation de la synthèse d'anion superoxyde.

5. Swelling

Le phénomène de transition de perméabilité mitochondrial est une étape clé de la signalisation de la mort cellulaire caractérisée par la perte de l'imperméabilité constitutionnelle de la membrane interne. Il provoque un gonflement caractéristique de la matrice (« swelling ») et un effondrement du $\Delta\Psi_m$. Cela s'accompagne non seulement d'un arrêt de la synthèse d'ATP, mais d'une hydrolyse de l'ATP [Argaud et al., 2006].

Dans cette étude nous avons étudié l'effet de la doxorubicine la perméabilisation de la MME de mitochondries isolées à partir de cœur de rats (Figure 46).

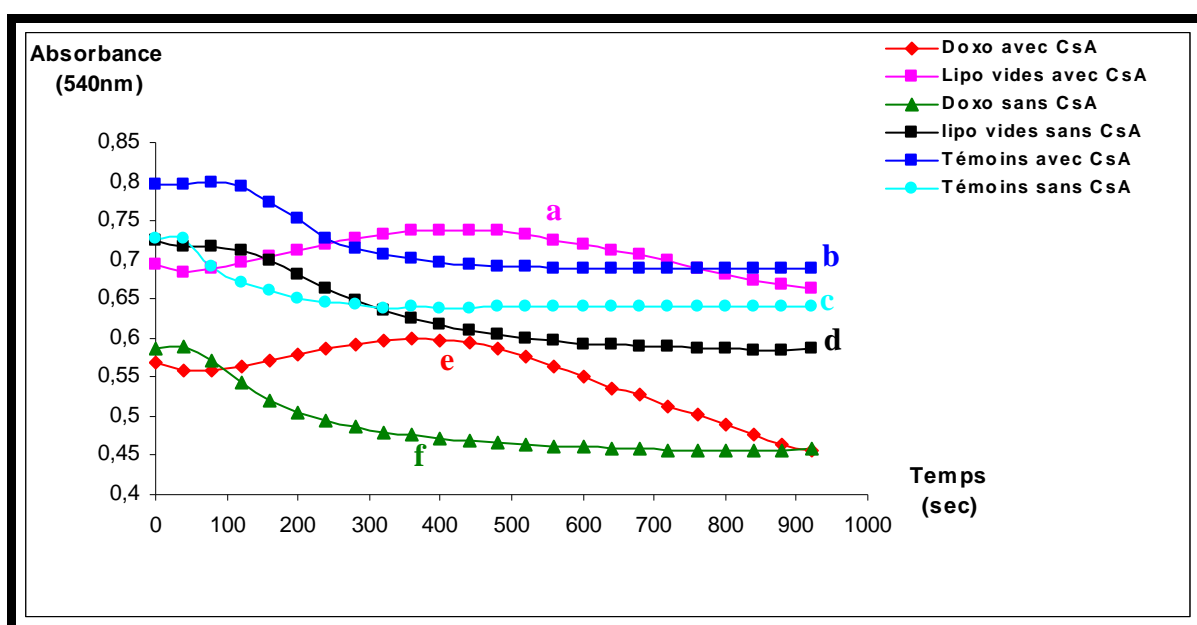


Fig.46: Etude de l'effet de la doxorubicine sur le gonflement mitochondrial.

In vitro, l'addition de calcium induit l'ouverture du pore de MPT qui se manifeste par une décroissance de l'absorbance, décroissance plus accentuée chez les rats traités (courbes e et f, $p < 0,001$) par rapport aux rats témoins (courbes c et d) et aux rats traités par des liposomes vides (courbes a et d) aussi bien en présence qu'en absence de cyclosporine A ou CsA ($p < 0,001$). Alors qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre témoins et rats recevant des liposomes vides ($p > 0,05$).

L'ouverture du pore et par conséquent le swelling est confirmé par l'addition de CsA, un inhibiteur spécifique du pore de transition de perméabilité mitochondrial (courbes a, b et e). En présence de CsA, la mitochondrie accumule et retient tous le Calcium ajouté ce qui permet d'inhiber le

gonflement : en présence de CsA, le gonflement est moins important qu'en son absence (courbes b et c pour les témoins, courbes a et d pour les rats liposomes et courbes e et f pour les rats traités). La CsA empêche l'ouverture du PTP en se fixant sur la cyclophiline D, protéine constitutive du pore [Argaud et al., 2006]. L'inhibition du swelling, induit par le calcium, suite à l'addition de CsA, n'est pas complète. En effet on remarque les tracés (a, b et e) montrent que la décroissance de l'absorbance en présence de CsA n'est observable qu'après un temps variant entre 3 et 8 minutes alors qu'en son absence (tracés c, d et f), la décroissance commence après 40 secondes. Au-delà de 3 ou 8 minutes (selon les rats) on observe une décroissance de l'absorbance, et par conséquent un gonflement des mitochondries.

Cette observation montre que la cyclosporine permet de limiter l'ouverture du pore mais ne l'empêcherait pas totalement. Ceci s'expliquerait par les conditions expérimentales : l'utilisation de petites cuves pour la lecture limiterait la diffusion de l'oxygène et provoquerait une hypoxie relative suite à la consommation de l'oxygène par les mitochondries, cette hypoxie est responsable d'un swelling par ouverture d'un canal MPT CsA-indépendant [Zhou et al., 2001b]. En outre, la figure 46 montre une stabilisation de la décroissance de l'absorbance se produisant à des temps différents, phénomène pouvant refléter l'altération des mitochondries en suspension.

En effet, la transition de perméabilité mitochondriale (MPT) définie comme étant une transition dans la perméabilité de la membrane mitochondriale interne s'observe quand in vitro des mitochondries sont traitées avec du calcium [Ca^{2+}] ou par des molécules qui augmentent le stress oxydatif [Zoratti et Szabo, 1995 ; Rahman et al., 2007].

6. L'effet de la doxorubicine sur la bioénergétique de Mitochondriale

Les anthracyclines peuvent interagir avec la mitochondrie à différents niveaux. Cependant, l'interaction la plus spécifique reste celle avec les enzymes mitochondriales, et beaucoup des effets secondaires des anthracyclines sur le cœur pourraient être expliqués par l'inhibition d'enzymes mitochondriales.

Dans cette optique, le contenu mitochondrial de cytochromes a+a3, b, c et c1 a été déterminé comme une indication de l'efficacité de la chaîne de transport d'électrons. La concentration en cytochromes nous a permis d'estimer l'importance relative des complexes III et IV dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Cytochromes b et c1: complexe III; Cytochromes a+a3 : complexe IV ; Cytochromes c : relais entre le complexe III et IV).

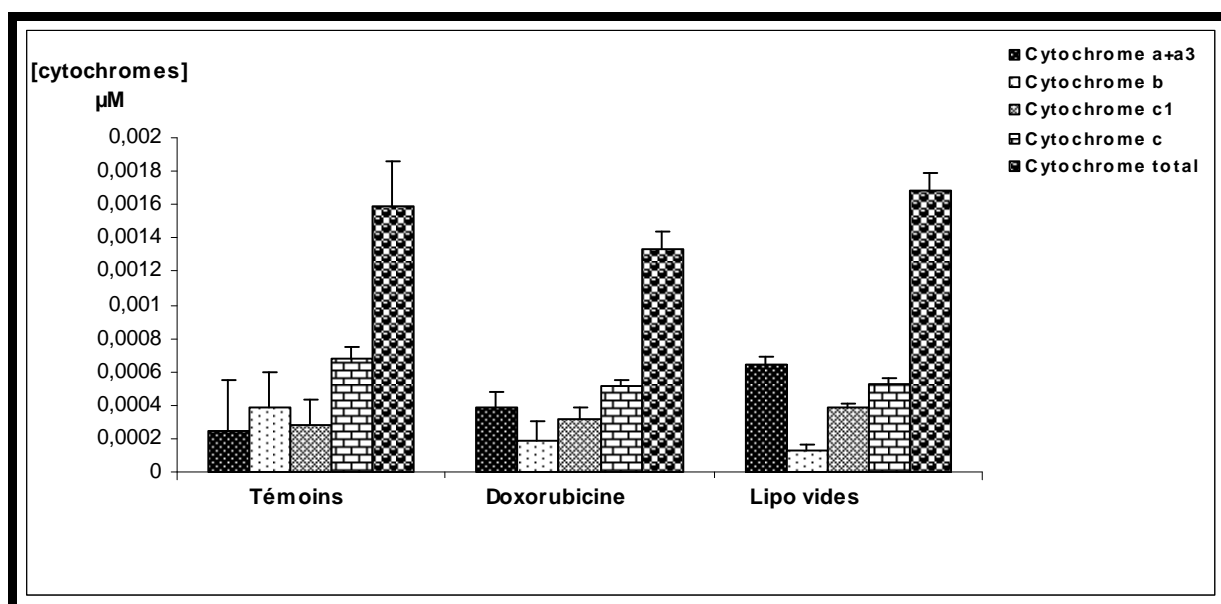


Fig.47: Comparaison de la concentration en cytochromes de mitochondries isolées de cœur de rats Wistar soumis à différents traitements.

Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de variation significative dans le contenu mitochondrial des différents types de cytochromes ($p > 0.05$) entre les mitochondries isolées de cœurs de rats traités par la doxorubicine et les mitochondries de rats témoins ou recevant des liposomes vides (Figure 47). Ce résultat laisse suggérer la possibilité que le traitement par la doxorubicine peut déprimer ou inhiber l'activité du cytochrome c oxydase par autre moyen que la modulation de son expression génique, résultats confortant les travaux de [Zhou et al., 2001b] et cette inhibition serait dose-dépendante [Jung et Reszka, 2001]. Ainsi, l'inhibition de l'activité du cytochrome c oxydase, entraînera une diminution de son activité et non une diminution de sa concentration ce qui pourrait expliquer nos résultats. Des auteurs [Papadopoulou et al., 1996b ; Papadopoulou et al., 1999a] rapportent que la doxorubicine est capable de déprimer l'expression du gène du cytochrome c oxydase.

Le mécanisme d'inhibition de la cytochrome c oxydase par les anthracyclines serait dû à un effet indirect. En effet, l'activité de plusieurs enzymes mitochondriales (NADH déshydrogénase, cytochrome c oxydase et cytochrome c réductase) est lipides-dépendante, plus exactement cardiolipides-dépendantes [Lee, 2004 ; Lenaz et al., 2009 ; Claypool, 2009]. Ainsi, la liaison des anthracyclines aux lipides membranaires se trouvant au voisinage de l'enzyme prive cet enzyme de son environnement de cardiolipides, environnement essentiel pour son activité [Tokarska-Schlattner et al., 2006] ce qui diminue sa mobilité ou empêche son orientation convenable pour qu'elle exerce son plein activité (modification des propriétés cinétiques). Cependant, d'autres auteurs [Papadopoulou et al., 1993c] rapportent une interaction

directe (liaison) entre l'enzyme cytochrome c oxydase libre et la doxorubicine, c'est le seul travail rapportant une telle interaction.

Quelque soit le mode d'interaction (direct ou non), les anthracyclines entraînent une inhibition de l'activité de l'enzyme et non un changement de sa concentration ce qui permet d'expliquer le résultat obtenu dans notre travail.

Il importe de savoir que, la doxorubicine se lie aux cardiolipides sous une forme polycationique à savoir sous complexe doxo-Fe(III), sous cette forme elle entraîne une inhibition complète du cytochrome c oxydase, alors que sous forme libre la doxorubicine est sans effet [Hasinof, 1990].

7. Effet protecteur de la propolis

L'intérêt d'un apport concomitant de flavonoïdes repose sur le fait que l'utilisation de ces nutriments comporte peu de risques vis-à-vis d'une éventuelle réduction de l'activité chimiothérapique de la doxorubicine. En effet, si le mécanisme d'action de nombreuses drogues de chimiothérapie repose sur la production de radicaux libres, il semble que ce mécanisme ne soit pas à la base de l'activité antitumorale ou cytotoxicité proprement dite de la doxorubicine (certains analogues structuraux tout autant cytotoxiques ne forment pas de radicaux libres) [Gouttebel et al., 1996].

Des études ont montré aussi qu'un traitement concomitant ou préventif précédant l'administration de doxorubicine chez le rat par des flavonoïdes diminuait les cardiomyopathies induites par la doxorubicine [Horakova et al., 2001 ; Bast et al., 2007]. Dans notre étude, nous confirmons une amélioration de la tolérance au traitement par la doxorubicine chez le rat, lors de la supplémentation orale en flavonoïdes. Nous avons mis en évidence une diminution de la peroxydation lipidique induite par la doxorubicine (Figure 48), alors quelle était importante chez les animaux traité et ne recevant pas de supplémentation. De plus nous avons obtenu une diminution dans la production d'anion superoxyde (Figure 49) et une inhibition du swelling.

Malgré ces résultats encourageants, le mécanisme d'action pouvant expliquer cet effet protecteur, des flavonoïdes vis-à-vis de la toxicité induite par la doxorubicine n'est pas encore bien connu. Nos résultats suggèrent que l'apport oral de ces nutriments pourrait avoir un effet anti-oxydant.

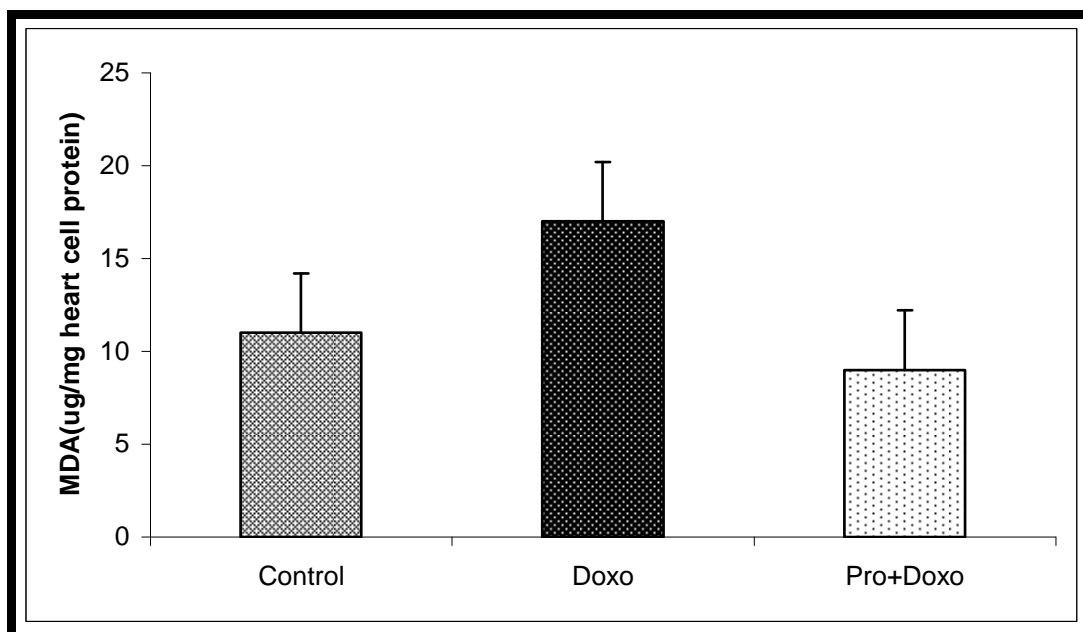


Fig.48: Effet d'une supplémentation orale en extrait de propolis sur le taux de TBARS (peroxydation lipidique) dans le cœur de rats traités par de la doxorubicine.

En effet, d'après de nombreuses études *in vitro* [Pannala et al., 2001 ; Laguerre et al., 2007] il en ressort qu'une substitution 1,2-dihydroxy ou structure catécholique de l'anneau de B (Figure 19) est le déterminant primaire ou majeur de l'activité antioxydante des flavonoïdes en accord avec la faible BDE des groupements OH correspondants. En général, on explique la meilleure efficacité antioxydante des ortho-diphénols par la stabilisation du radical phenoxy AO^{\bullet} au moyen de la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire [Laguerre et al., 2007].

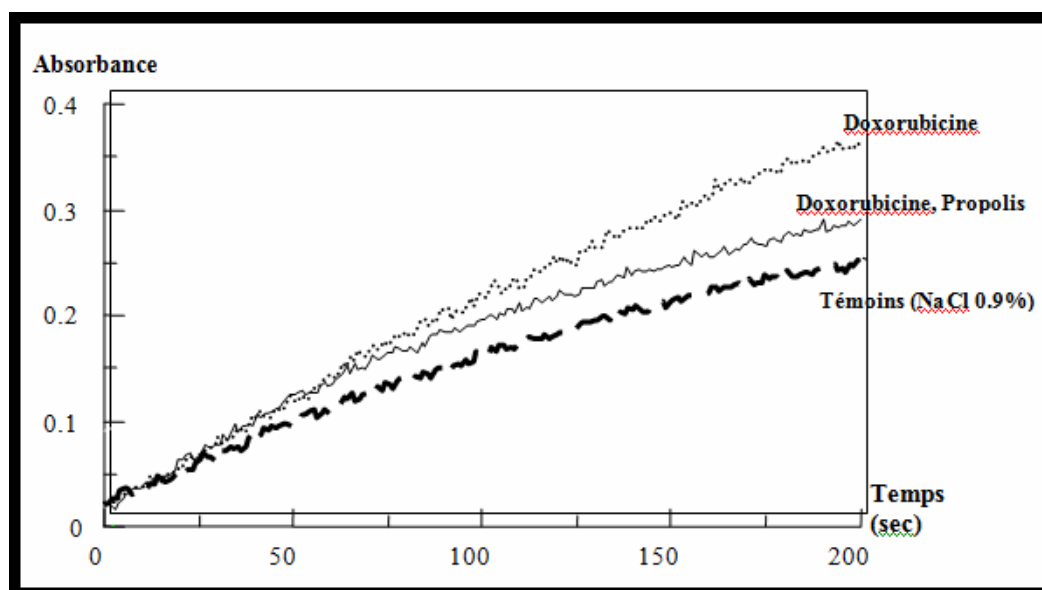


Fig.49: Effet d'une supplémentation orale en extrait de propolis sur la production d'anion superoxyde par des mitochondries isolées de cœurs de rats traités par de la doxorubicine.

En théorie, les polyphénols (entre autres les flavonoïdes) semblent être capables de réduire les peroxyradicaux. Néanmoins, leur caractère hydrophile et leur éloignement de ces radicaux lipophiles semblent empêcher toute action directe par contact.

In vivo, il semble selon toute vraisemblance, que les flavonoïdes agissent de la même façon que l'acide ascorbique. Cette voie d'action impliquerait la régénération du radical tocophéroxyl en tocophérol par l'oxydation du polyphénol en radical phénoxy [Laguerre et al., 2007].

CONCLUSION

Conclusion

Les anthracyclines, incontournables dans la plupart des protocoles de chimiothérapie, ont permis de grands progrès dans le traitement et la prise en charge de certains cancers. Cependant les anthracyclines induisent, de façon dose dépendante, une cardiomyopathie chronique pouvant évoluer à plus ou moins long terme vers une insuffisance cardiaque de très mauvais pronostic. Cette toxicité cardiaque, connue dès leur utilisation en clinique, représente un des facteurs limitant leur utilisation prolongée ou leur réintroduction. La prévention de cette cardiotoxicité repose une meilleure connaissance du mécanisme d'action et notamment du rôle de la mitochondrie dans cette toxicité qui semble ne pas se résumer juste à une production de ROS étant donné que l'emploi d'agents cardioprotecteurs, couplés à la chimiothérapie, ne permet pas toujours de prévenir ou de réduire cette toxicité.

Notre étude se focalise sur l'exploration des mécanismes moléculaires de la cardiotoxicité induite par l'administration IP d'une dose aiguë de doxorubicine ainsi qu'à l'évaluation de l'effet protecteur des flavonoïdes extraits à partir de la propolis.

Nos données expérimentales suggèrent que le stress oxydatif généré par la doxorubicine est dû à la génération de radicaux libres oxygénés dans le tissu cardiaque.

Tissu cardiaque est particulièrement plus sensible aux effets nocifs des radicaux libres, à raison de son faible taux en défenses (molécules ou enzymes) antioxydantes comme la SOD, GSH et CAT. De plus, la doxorubicine a également une forte affinité pour les phospholipides de la membrane mitochondriale interne du myocyte cardiaque, ce qui conduit à l'accumulation de la doxorubicine dans le tissu cardiaque. Ainsi, l'altération de la fonction mitochondriale (source principale d'ATP) par la doxorubicine est critique pour le cœur, étant donné le rôle de l'ATP dans la fonction contractile des myocytes cardiaques.

L'atteinte cardiaque secondaire à l'administration de la doxorubicine chez le rat a été révélée par l'augmentation du taux sériques de CPK, LDH, TGO et TGP. L'augmentation de la LDH dans le sérum des rats traités par rapport aux rats témoins suggère une augmentation de la fuite de cette enzyme à partir des mitochondries suite à l'altération de cet organe par la doxorubicine.

D'autre part, l'étude *in vitro*, a permis de révéler que la doxorubicine entraîne toxicité précoce, 2 à 3H après l'injection de doxorubicine (toxicité révélée par le test MTT) alors que les cellules semblent intacts (test LDH négatif). A forte doses, le test LDH était positif ce qui laisse suggérer que l'apoptose est la mort cellulaire qui prédomine à faible dose, alors qu'à dose élevée c'est la nécrose. La mesure des caspases dans le futur permettra de ratifier ou d'infirmer ce constat.

La peroxydation lipidique est connue pour être responsable de dommages cellulaires. Une augmentation du taux de MDA et une du taux de GSH ou une augmentation du taux de GSH ont été observées dans le tissu cardiaque en fonction de la dose utilisée de doxorubicine. Une augmentation du taux de GSH soutient l'hypothèse que cette augmentation peut-être nécessaire pour contre carré un stress oxydatif excessif.

En outre, l'apport oral de flavonoïdes semble permettre une réduction de la toxicité cardiaque des traitements comportant des anthracyclines. L'apport de ces nutriments pourrait donc représenter une thérapeutique non négligeable pour tous les patients - surtout s'ils sont dénutris - atteints d'une tumeur maligne justiciable d'un traitement par la doxorubicine.

Quant aux travaux s'intéressant à l'encapsulation de la doxorubicine dans des liposomes, ils ont des résultats largement dépendant du type de lipides et de leurs proportions utilisées dans la fabrication des liposomes.

D'ailleurs, notre étude galénique était limitée juste à l'encapsulation de la doxorubicine dans des liposomes de 2^{ème} génération avec un taux de 70% ainsi qu'à l'étude de leur stabilité dans le temps. Des liposomes vides ont été testés *in vivo* et *in vitro* montrant l'absence de toxicité des lipides utilisés.

Le résultat de cette étude a été de mettre en évidence le rôle qu'occupe la mitochondrie via sa chaîne respiratoire dans la genèse du stress oxydatif responsable de la cardiotoxicité des anthracyclines ainsi que l'effet protecteur des flavonoïdes extraits de la propolis algérienne.

Ces résultats prennent un intérêt majeur et ouvrent de grandes perspectives si l'on considère la quantification du stress oxydatif et des radicaux libres est encore à ce jour un challenge.

BIBLIOGRAPHIE

Références

- Abraham S.A.**, Edwards K., Karlsson G., Macintosh S., Mayer L.D., McKenzie C., Bally M.B. Formation of transition meta-doxorubicin complexes inside liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* (2002) 1565: 41-54.
- Abraham S.A.**, Waterhouse D.N., Mayer L.D., Cullis P.R., Madden T.D., Bally M.B. The liposomal formulation of doxorubicin. In: Nejat Duzgunes ed. *Methods in Enzymology*. Academic Press (2005) 391: 71-97.
- Alyane M.**, Benguedouar L., Kebsa W., Bousenane H.N., Rouibah H., Lahouel M. Cardioprotective effects and mechanism of action of Polyphenols extracted from Propolis against Doxorubicin toxicity. *Pak J Pharm Sci* (2008) 3: 201-209.
- André N.**, Rome A., Carré M. Actualités scientifiques: Contribution de la Société francophone de recherche en pédiatrie (SFRP). «Les agents antimitochondriaux : une nouvelle classe d'agents anticancéreux ». *Archives de Pédiatrie* (2006) 13 : 69 -75.
- Andrieu-Abadie N.**, Levade T., Laurent G., Hatem S., Mercadier J.J.N. Le céramide à l'origine de la cardiotoxicité de la doxorubicine?. *Médecine/Sciences* (1999) 15: 1322-1324.
- Anonyme.** User manuel, Zetasizer nano series. *Malvern instruments*; UK 2004.
- Argaud L.**, Ovize M., Robert D. La mitochondrie: une cible incontournable de la cardioprotection du myocarde ischémique. *Réanimation* (2006) 15 :109 -116.
- Armstrong J.S.** The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion* (2006) 6: 225 -234.
- Arousseau B.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Productions Animales* (2002) 15: 67-82.
- Babior B.M.** Phagocytes and oxidative stress. *American Journal of Medicine* (2000) 109: 33-44.
- Barenholz Y.** Liposome application: problems and prospects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* (2001) 6: 66 - 77.
- Basso E.**, Fante L., Fowlkes J., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *Journal of Biological Chemistry* (2005) 280: 18558 - 18561.
- Bast A.**, Kaiserova H., Den Hartog G.J.M., GRMM H., Van der Vijgh W.J.F. Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity: Flavonoids. *Cell Biol Toxicol* (2007) 23: 39 - 47.
- Bernardi P.**, Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blalchy-Dyson E., Di Lisa F., Forte M.A. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS Journal* (2006) 273: 2077 - 2099.
- Bernuzzi F.**, Recalcati S., Alberghini A., Cairo G. Reactive oxygen species-independent apoptosis in doxorubicin-treated H9c2 cardiomyocytes: Role for heme oxygenase-1 down-modulation. *Chemico-Biological Interactions* (2009) 177: 12 - 20.

- Boutolleau D.**, Lefèvre G., Étienne J. Glutathione assay with GSH-400 method: interest of derivative spectrophotometry. *Annales de Biologie Clinique* (1997) 55: 592-6.
- Brenner C.**, Marzo I., Zamzami N., Susin S.A., Vieira H.L.A., Kroemer G. Coopération mortelle entre la protéine pro-apoptotique Bax et le translocateur à adénine nucléotide pour le contrôle mitochondrial de l'apoptose. *Médecine/Sciences* (1998) 14: 1399 - 401.
- Brookes P.S.**, Yoon Y., Robotham J.L., Anders M.W., Sheu S.S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol* (2004) 287: 817-833.
- Burdock G. A.** Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology* (1998) 36: 347-363.
- Cadenas E.**, Davies K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging . *Free Radical Biology and Medicine* (2000) 29: 222-230.
- Chabner B.A.**, Amrein P.C., Druker B.J., Michaelson M.D., Mitsiades C.S., Goss P.E., Ryan D.P., Ramachandra S., Richardson P.G., Supko J.G., Wilson W.H. : Antineoplastic agents. In: Brunton L.L. ed. The Pharmacological Basis of Therapeutics -11th Ed. série Goodman & Gilman's. *The McGraw-Hill Companies*, (2006).
- Chira K.**, Suh J-H., Saucier C. Teissèdre P-L. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* (2008) 6: 75 - 82.
- Chopra S.**, Pillai S.Z., Husain S.Z., Giri D.K. Propolis protects against doxorubici-induced myocardopathy in rats. *Experimental and molecular pathology* (1995) 62: 190 -198.
- Chuto G.**, Chaumet-Riffaud P. Les nanoparticules. *Médecine Nucléaire* (2010), doi:10.1016/j.mednuc.2010.03.003
- Cillard J.**, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides (OCL)* (2006) 13: 24-29.
- Claypool S.M.** Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* (2009) 1788: 2059-2068.
- Cutts, S. M.**, D. R. Phillips. Use of oligonucleotides to define the site of interstrand cross-links induced by Adriamycin. *Nucleic Acids Research* (1995) 23: 2450 - 2456.
- Debray M.M.** Contribution à l'inventaire des plantes médicinales du massif du Tsaratanana. *Mém. ORSTOM* (1970) 37: 231-237.
- Delemasure S.**, Vergely C., Zeller M., Cottin Y., Rochette L. Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines : approche fondamentale des mécanismes mis en jeu ; relations avec les données cliniques. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* (2006) 55: 104 -112.
- Diamantis A.**, Magiorkinisa E., Sakorafas G.H., Androutsos G. A Brief History of Apoptosis: From Ancient to Modern Times. *Onkologie* (2008) 31:702 - 706.
- Di Carlo G.**, Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* (1999) 65: 337-353.

- Dousset N.**, Douste-Blazy L. Méthodes de préparation des liposomes. In : Puisieux F., Delattre J. eds. Les liposomes (applications thérapeutiques), Edition *TEC & DOC (Lavoisier)*, Paris (1985): 41-67.
- Dutau G.** Le risque allergique des produits diététiques et médicinaux. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* (2004) 44: 634 - 645.
- Dutau G.**, Rancé F. Allergies au miel et aux produits de la ruche. *Revue française d'allergologie* (2009) 49 : 16–22.
- Ellis C.E.**, Naicker D., Basson K.M., Botha C.J., Meintjes R.A., Schultz R.A. Cytotoxicity and ultrastructural changes in H9c2(2-1) cells treated with pavetamine, a novel polyamine, *Toxicon* (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2008.11.017.
- Eymard S.** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. *Thèse de doctorat, Université de Nantes* (2003).
- Fattal E.**, Couvreur P., Puisieux F. Méthodes de préparations des liposomes. In : Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J-R., Schuber F. eds, Les liposomes : aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. *INSERM et TEC & DOC-LAVOISIER* Paris (1993): 43-62.
- Favier A.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* (2003): 108-115
- Favier A.** The oxidative stress: interest of its monitoring in clinical chemistry and problems of the choice of an appropriate parameter. *Annales de Biologie Clinique* (1997) 55: 9 -16.
- Fenske D.B.**, Cullis P.R. Encapsulation of drug within liposomes by pH-gradient techniques. In: Gregoriadis G. ed, liposome technology, third edition, volume II: entrapment of drugs and other materials into liposomes. *Informa healthcare*, New York (2007): 27-45.
- Fritze A.**, Hens F., Kimpfler A., Schubert R., Peschka-Süss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochimica et Biophysica Acta* (2006) 1758: 1633-1640.
- Garrett R.H.**, et Grisham C.M. Biochimie. *De Boeck Université, Bruxelles*, (2000): 371.
- Ghedira K.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* (2005) 4: 162-169.
- Ghedira K.**, Goetz P., Le Jeune R. Propolis. *Phytothérapie* (2009) 7: 100 - 105.
- Gomez-Caravaca A.M.**, Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2006) 41: 1220 - 1234.
- Goormaghtigh E.**, Huart P., Praet M., Brasseur M., Ruyschaert J.M. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem* (1999) 35:247-257.
- Gouttebel M-C.**, Zhang G.H., Saingra B., Joyeux H. Rôle protecteur d'un apport oral de sélénium et de vitamine E vis-à-vis de la cardiotoxicité induite par les anthracyclines chez le rat. *Nutr. Clin. Métabol* (1996) 10: 69-76.

- Green S.P.**, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* (2002) 1588: 94-101.
- Grivennikova V.G.**, Vinogradov A.D. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1757: 553-61.
- Guano F.**, Pourquier P., Tinelli S., Binaschi M., Bigioni M., Animati F., Manzini S., Zunino F., Kohlhagen G., Pommier Y., Capranico G. Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol Pharmacol* (1999) 56: 77-84.
- Guichardant M.**, Bacot S., Molière P., Lagarde M. Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides (OCL)* (2006) 13: 31-34.
- Halliwell B.**, Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 4^{ème} édition. *Oxford university press*, New York (2007): 47-48, 265-266, 567.
- Hande K.R.** Clinicat applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1400: 173-184.
- Hasinoff B.B.** Inhibition and inactivation of NADH-cytochrome c reductase activity of bovine heart submitochondrial particles by the iron(III)-adriamycin complex. *Biochem Journal* (1990) 265: 865-70.
- Havsteen B.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* (2002) 96: 67 -202.
- Hegazi A.G.** Propolis: An overview. Congreso Internacional de propoleos. Durante los dias 1 y 2 de Septiembre de 2000 en Buenos Aires – Argentina.
- Horakova K.**, Sovcikova A., Seemannova Z., Syrova D., Busanyova K., Drobna Z., Ferencik M. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free.Radic. Biol. Med.* (2001) 15: 650-64.
- Hortobàgyi G.N.** Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs* (1997) 54: 1-7.
- Hrelia S.**, , Fiorentini D., Maraldi T., Angeloni C., Bordoni A., Biagi P.L., Hakim G. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* (2002)1567: 150-156.
- Iarussi D.**, Indolfi P., Casale F., Coppolino P., Tedesco M.A., Di Tullio M.T. Recent advances in the prevention of anthracycline cardiotoxicity in childhood. *Curr Med Chem* (2001) 8: 1649-1660.
- Ishida T.**, Ichihara M., Wang X.Y., Kiwada H. Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of Pegylated liposomes. *Journal of controlled release* (2006)115: 243-250.
- Janero D.R.** Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* (1990) 9: 515-40.
- Jacquemin H.**, Boissonnat A., Faugeras G., Tillequin F.,Delaveau P. Flavonoïdes de *Glycoxylon huberi* Ducke. *Annales de pharmaceutiques françaises* (1985) 43: 521-525.

- Jung K.**, Reszka R. Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001) 49: 87 - 105.
- Koti B.C.**, Vishwanathswamy A.H.M., Wagawade J., Thippeswamy A.H.M. Cardioprotective effect of lipistat against doxorubicin induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian Journal of Experimental Biology* (2009) 47: 41-46.
- Kowaltowski A.J.**, De Souza-Pinto N.C., Castilho R.F., Vercesi A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine* (2009) 47: 333 - 343.
- Kumazawa S.**, Hamasaka T., Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* (2004) 84: 329 - 339.
- Laguerre M.**, López-giraldo L.J., Lecomte J., Pina M., Villeneuve P. Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* (2007)14: 278-92.
- Lahouel M.**, Fillastre J.P. Role of flavonoids in the prevention of hematotoxicity due to chemotherapeutic agents. *Haema* (2004) 7: 313-320.
- Lauzon C.** Etude des mécanismes de toxicité induite par l'adrimycine et sensibilisation des cellules cancéreuses par le choc thermique. Thèse de l'université du Québec à montréal, 2008.
- Lavelle F.** Activité expérimentale de la THP-doxorubicine. In: Jaquillat C., Weil M., Khayat D eds. Neo-Adjuvant Chemotherapy; Second International Congress. *INSERM/John Libbey Eurotext* (1988) 169: 803-806.
- Lee A.G.** How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes* (2004)1666: 62-87.
- Lefèvre G.**, Beljean-Leymarie M., Beyerle F., Bonnefont-Rousselot D., Cristol J-P., Thérond P., Torreilles J. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de biologie clinique* (1998) 56: 305-319.
- Lemasters J.J.**, Qian T., He L., Kim J.S., Elmore S.P., Cascio W.E., Brenner D.A. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid. Redox Signal* (2002) 5: 769 - 781.
- Lenaz G.**, Genova M.L. Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: A dynamic super-assembly. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2009) 41: 1750-1772.
- Liu Y.**, Fiskum G., Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry* (2002) 80: 780-7.
- Lorin A.**, Flore C., Thomas A., Brasseur R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* (2004) 8: 163 - 176.
- Lotfy M.** Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (2006) 7: 22-31.

- Luo X.**, Evrovsky Y., Cole D., Trines J., Benson L.N., Lehotay D.C. Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochim Biophys Acta* (1997) 1360: 45-52.
- Iyer A.K.**, Khaled G., Fang J., Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* (2006) 11: 812-818.
- Machy P.**, Leserman L. Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie. Editions *INSERM*, Paris (1987): 4-18, 27-95.
- Marchetti P.** Apoptosis: basic knowledge and applications. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* (2005) 33: 632 - 641.
- Marcot I.**, Migeon C., Parache R-M., Marchal S., Virion J-M. Comparative evaluation of quantitative immunocytochemical and biochemical assays for hormone receptors in breast cancer. *Bulletin du Cancer* (1997) 84: 613-18.
- Marcucci M.C.** Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* (1995) 26: 83-99.
- Mayer L.D.**, Tai L.C.L., Bally M.B., Mitilenes G.N., Ginsberg R.S., Cullis P.R. Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. *Biochimica et Biophysica Acta* (1990) 1025: 143-151.
- Métézeau P.**, Vielh P. Cytométrie et oncologie : approche technique, intérêt et limites, perspectives. *Bulletin du Cancer*. (2001) 88: 15-22.
- Minotti G.**, Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., and Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* (2004) 56: 185-229.
- Miyashita T.**, Reed J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcription activator of the human bax gene. *Cell* (1998) 80: 293-299.
- Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunol Methods* (1983) 65: 55-63.
- Moufti A.**, Genin I., Madelmont G., deyme M., Schneider M., Puisieux F. Relationship between iodine value and phase transition temperature in natural hydrogenated phospholipids. In: Hanin I., Pepeu G. eds, phospholipids: Biochemical, Pharmaceutical, and Analytical Considerations. *Plenm Press*, New York (1990): 283-286.
- Mráček T.**, Pecinová A., Vrbacký M., Drahotá Z., Houštěk J. High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2009) 481: 30-36.
- Muindi J.**, Sinha B.K., Gianni L., Myers C. Thiol-dependent DNA damage produced by anthracycline-iron complexes. The structure-activity relationships and molecular mechanisms. *Journal of Mol Pharmacol* (1985)3: 356-65.
- Murray R.K.** Biomolécules et methods biochimiques. In : Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W eds. Biochimie de Harper. Les Presses de l'Université Laval, Canada (2002): 6-14.

- Myers C.** The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* (1998) 25: 10-14.
- Nivière V., Fontecave M.** Biological sources of reduced oxygen species. In: Analysis of Free Radicals in Biological Systems, by: Favier A.E., Cadet J., Kalyanaraman B., Fontecave M., Pierre J-L. eds. *Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland* (1995): 11-19.
- Ogawara K., Tanaka K., Higaki K., Kimura T.** In vivo anti-tumor effect of PEG liposomal doxorubicin (DOX) in DOX-resistant tumor-bearing mice: involvement of cytotoxic effect on vascular endothelial cells. *Journal of controlled release* (2008), doi: 10.1016/j.jconrel.2008.09.008.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry* (1979) 95: 351-358.
- Oliveira P.J., Wallace K.B.** Depletion of adenine nucleotide translocator protein in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats-Relevance for mitochondrial dysfunction. *Toxicology* (2006) 220: 160 - 168.
- Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L.** Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* (2007) 87: 315-424.
- Pannala A.S., Chan T.S., O'Brien P.J., Rice-Evans C.A.** Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2001) 282: 1161-1168.
- Papadopoulou L.C., Theophilidis G., Thomopoulos G.N., Tsiftoglou A.S.** Structural and functional impairment of mitochondrial in Adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. *Biochem. Pharmacol* (1999a) 57: 481 - 489.
- Papadopoulou L.C., Tsiftoglou A.S.** Effects of hemin on apoptosis, suppression of cytochrome c oxidase gene expression and bone marrow toxicity induced by Adriamycin. *Biochem. Pharmacol* (1996b) 52: 713 - 722.
- Papadopoulou L.C., Tsiftoglou A.S.** Mitochondrial cytochrome c oxidase as a target site for daunomycin in K-562 cells and heart tissue. *Cancer Res.* (1993c) 53: 1072 - 1078.
- Patrick G.L., Depovere P.** Chimie pharmaceutique. De Boek Université, Belgique (2002): 127-128.
- Pein F., Vassal G., Sakiroglu C., Tournade M.F., Lemerle J.** Aspects pédiatriques de la toxicité cardiaque des anthracyclines et implications pratiques pour sa prévention. *Archives Pédiatriques* (1995) 2: 988-999.
- Petit T.** Toxicité cardiaque des anthracyclines. *Bulletin du Cancer* (2004) 91: 159-65.
- Plats D., Baudrant M., Ratsimbazafy V.** Liposomes et formes pégyliées : revue des médicaments disponibles. *Actualités pharmaceutiques hospitalières* (2005) 3: 46-60.
- Puisieux F., Roblot-Treupel L.** Vectorisation et vecteurs de médicaments. *S.T.P. Pharma* (1989) 52: 107-113.
- Rahman A.M., Yusuf S.W., Ewer M.S.** Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *International Journal of Nanomedicine* (2007) 2: 567 - 583.

- Robert J.** Anthracyclines. In : Cancer Clinical Pharmacology by: Shellens J.H.M., McLeod H.L., Newel D.R. eds, *Oxford University Press*, USA (2005): 117-133.
- Saint-Pierre J.**, Buckingham J.A, Roebuck S.J., Brand M.D. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Journal of Biological Chemistry* (2002) 277: 44784 - 44790.
- Santra K.**, Mukherjee B. Liposomes and their application(an overview). *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology* (2009) 2: 1-13.
- Schmitz I.**, Kirchhoff S., Krammer P.H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2000) 32: 1123 - 1136.
- Sedlak J.**, Lindsay R.H. Estimation of total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* (1968) 25: 192-205.
- Singal P.K.**, Iliskovic N., Li T., Kaur K. Heart failure due to doxorubicin. *Kuwait Medical Journal* (2001) 33(2): 111-115
- Staniek K.**, Nohl H. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochimica et Biophysica Acta* (2000) 1460: 268-275.
- Storm G.**, Crommelin D.J.A. Liposomes: quo vadis? *Pharmaceutical Science & Technology Today* (1998) 1: 19-31.
- Takemura G.**, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic macanismes to management. *Progress in Cardiovascular Diseases* (2007) 49: 330-352.
- Tardi P.G.**, Boman N.L., Cullis P.R. Liposomal doxorubicin. *Journal of Drug Targeting* (1996) 4: 129-140.
- Tokarska-Schlattner M.**, Dolder M., Gerber I., Speer O., Wallimann T., Schlattner U. Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: Particular sensitivity of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta* (2007) 1767: 1276-1284.
- Torchilin V.P.** Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2006) 58: 1532-1555.
- Trusheva B.**, Trunkova D., Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal* (2007)1:10 -13.
- Tsuruo T.**, Naito M., Tomida A., Fujita N., Mashima T., Sakamoto H., Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* (2003) 94: 15 - 21.
- Turrens J.F.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* (2003) 552: 335 -344.
- Turrens J.F.** Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports* (1997) 17: 3 - 8.
- Vander Heide R.S.**, L'Ecuyer T.J. Molecular basis of anthracycline induced Cardiotoxicity. *Heart Metab* (2007) 35: 1 - 4.

- Venkatesan N.** Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *British Journal of Pharmacology* (1998) 124: 425-427.
- Vergely C., Rochette L.** Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique Cardiologie* (2003) 1: 131-9.
- Vinogradov A.D., Grivennikova V.G.** Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* (2005) 70: 120-7.
- Wagner H., Bladt S.** Plant drug analysis. A thin layer chromatography Atlas. *Springer New York* (2001): 195.
- Wang X., Yang L., Chen Z.G., Shin D.M.** Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *Cancer Journal for Clinicians*. (2008) 58: 97-110.
- Waterborg J.H., Matthews H.R.** The Lowry Method for Protein Quantitation. In: Walker J.M ed. The Protein Protocols Handbook, Humana Press Inc, Totawa (1986).
- Weil M.** Historique des anthracyclines. In: Jaquillat C., Weil M., Khayat D eds. Neo-Adjuvant Chemotherapy; Second International Congress. *INSERM/John Libbey Eurotext* (1988) 169: 799-802.
- Weiss J.N., Korge P., Honda H.M., Ping P.** Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circulation Research* (2003) 93: 292 - 301.
- Williams J.N.** A method for the simultaneous quantitative estimation of Cytochromes a, b, c1, and c in mitochondria. *Archive of Biochemistry and Biophysics* (1964) 107: 537-543.
- Xiong X-B., Huang Y., Lu W-L., Zhang X., Zhang H., Nagai T., Zhang Q.** Enhanced intracellular delivery and improved antitumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic. *Journal of Controlled Release* (2005) 107: 262-275.
- Yin X., Wu H., Chen Y., Kang Y.J.** Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem. Pharmacol* (1998) 56: 87-93.
- Youn H.J., Kim H.S., Jeon M.H., Lee J.H., Seo Y.J., Lee Y.J., Lee J.H.** Induction of caspase-independent apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by adriamycin treatment. *Molecular and Cellular Biochemistry* (2005) 270: 13 -19.
- Zhou S., Palmeira C.M., Wallace K.B.** Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac Myocytes. *Toxicology Letters* (2001a) 121: 151 - 157.
- Zhou S., Starkov A., Froberg M.K., Leino R.L., Wallace K.B.** Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Research* (2001b) 61: 771-777.
- Zoratti M., Szabo L.** The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta* (1995) 1241: 139-176.

ANNEXES

Annexes

1. Cultures cellulaires

1.1. *Entretien des cellules*

Pour prévenir la perte de viabilité des cellules H9c2 en culture suite au phénomène de confluence, les cellules devraient être repiquées avant qu'elles deviennent confluentes.

Avant que les cellules soient à confluence, c'est-à-dire qu'elles forment une couche cellulaire :

1°/ Le milieu de culture est aspiré et ensuite la boîte de Pétri est rincée avec 10 ml de PBS 1X sans calcium ni magnésium (qui favorisent les jonctions intercellulaires) de façon à éliminer toutes traces du milieu. En effet, le SVF présent dans le milieu inhiberait l'action de la trypsine que l'on ajoute, ensuite, pour décoller les cellules.

2°/ Après aspiration du tampon de rinçage, les cellules restent adhérentes à la boîte de Pétri.

3°/ 1 ml de 0.5% (w/v) Trypsine-0.53 mM EDTA est ajouté et réparti sur les cellules. Les boîtes de Pétri sont mises 10min à l'étuve à 37°C pour faciliter la trypsination qui provoque le décollement des cellules.

4°/ 7 ml de milieu de culture de base complété sont ajoutés (le SVF arrête l'action de la trypsine avant d'abîmer les cellules) et la boîte est agitée doucement pour mettre les cellules en suspension..

5°/ Pour une division de 1/4, 2ml de la suspension cellulaire de chaque boîte de Pétri est mélangé avec 8 ml de milieu frais et les cultures sont remis l'étuve jusqu'au prochain passage.

Après 30 passages, pour éviter toute dérive de la lignée, la culture est redémarrée en redécongelant une autre tube de cellules conservées en azote liquide.

1.2. *Décongélation de la lignée*

Le tube contenant la lignée est décongelée rapidement dans le bain marie à 37°C. Puis on transvase le contenu est transvasé immédiatement dans un T75cm² (ou une boîte de Pétri de 10cm de diamètre) contenant 15 ml de milieu complet.

Cette étape doit être rapide car le DMSO contenu dans le milieu de congélation est toxique pour les cellules.

1.3. *Congélation de la lignée*

Les cellules à congeler doivent être à 80% de confluence,

1°/ Le milieu est aspiré

2°/ Les cellules sont trypsinisées (voir ci-dessus)

3°/ Les cellules sont reprises dans du milieu complété.

4°/ Centrifuger la suspension cellulaire est centrifugée dans des tubes de 50 ml stériles, fonds coniques pendant 5 minutes à 1000 RPM et à température ambiante. Le surnageant est éliminé.

5°/ Les culots cellulaires sont repris ensemble dans xml (x étant le nombre tubes de congélation) de milieu de congélation.

6°/ La suspension cellulaire est aliquotée par 1ml dans des cryotubes.

7°/ Les tubes sont mises 1h à 4°C ,1h à – 20°C, puis 1h à une nuit à -80°C, puis dans l'azote liquide.

La culture originale est conservée le temps de tester la congélation (en décongelant le lendemain une ampoule nouvellement congelée après passage dans l'azote).

1.4. Tampons et milieux

- Penicilline-Streptomycine:10000 U/ml/ 10000µg/ml. Stock aliquoté par 2.5ml et stocké à -20°C.
- Sérum de veau foetal (SVF) : aliquoté par 50 ml et conservé à -20°
- HI-SVF (heat inactivated SVF ou décomplémentation) : chauffé dans la bouteille 30min à 56°C, puis éventuellement filtrer sur 0.2µm ou 0.45µ (la filtration sert juste à retenir les précipités).
- PBS1X (sans calcium et sans magnésium)
- Trypsine/EDTA: solution stock, Trypsine-EDTA 10X (0.5% Trypsine) stockée à -20°C ou 1X. Si 10X, à diluer 1/10 dans du PBS (se garde alors à 4°C pendant plusieurs semaines, mais au bout de 2 mois, l'activité enzymatique diminue)
- Préparation du milieu : 447.5ml de milieu + 2.5 ml Penn-strep + 50 ml de SVF (10 % final).

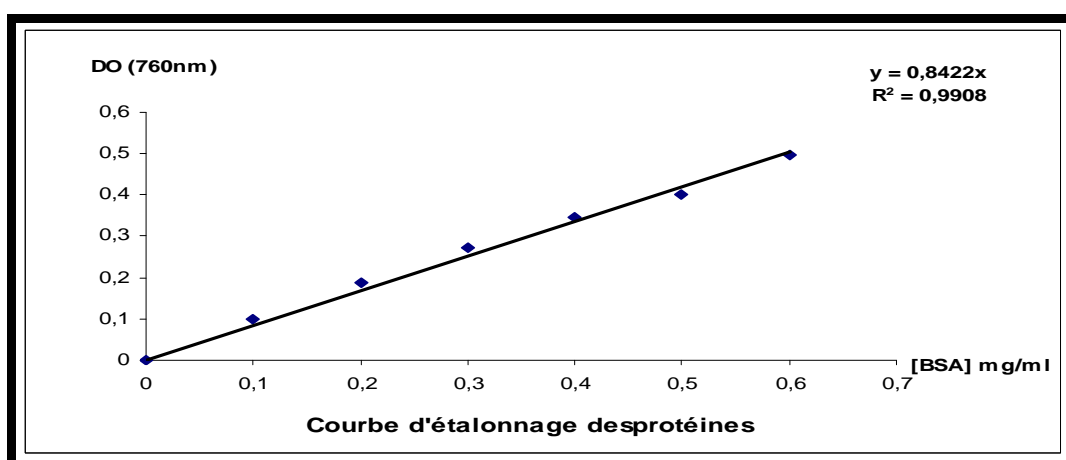
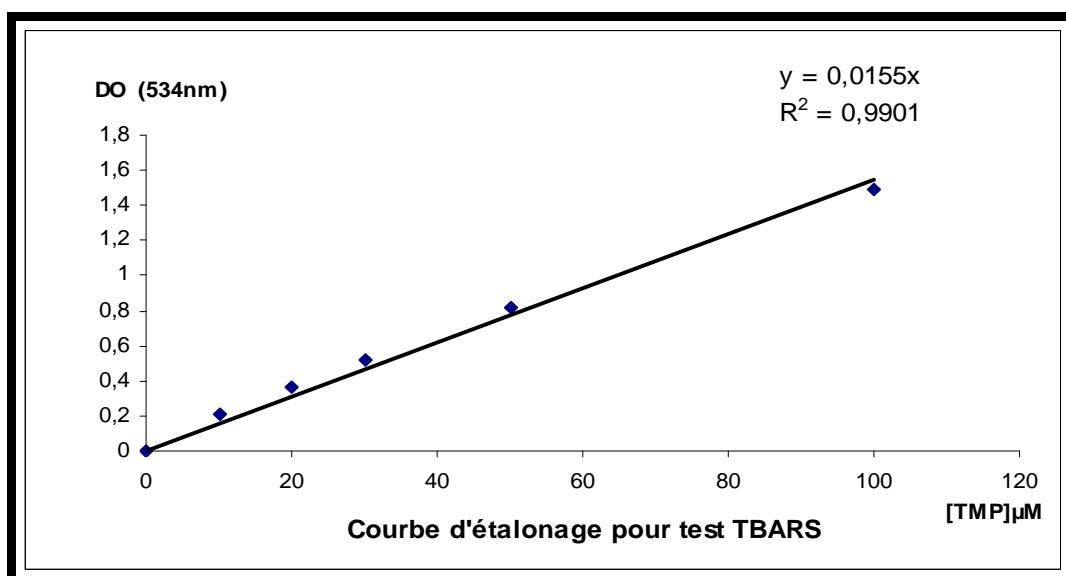
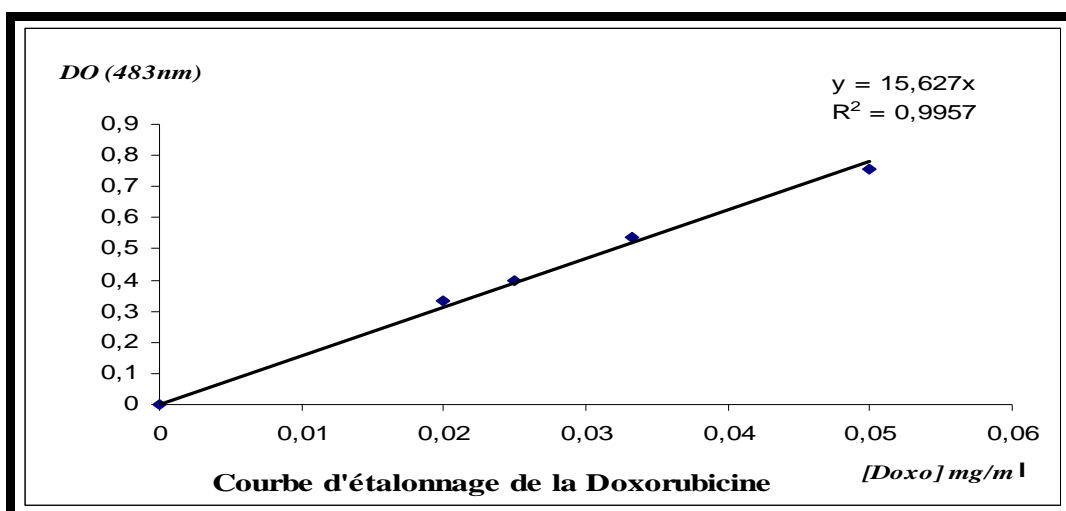
Quand les cellules ne semblent pas en forme, à la pourcentage de de SVF peut être augmentée à 20%. Le milieu complet se garde à 4°C plusieurs semaines (jusqu'à 12 semaines).

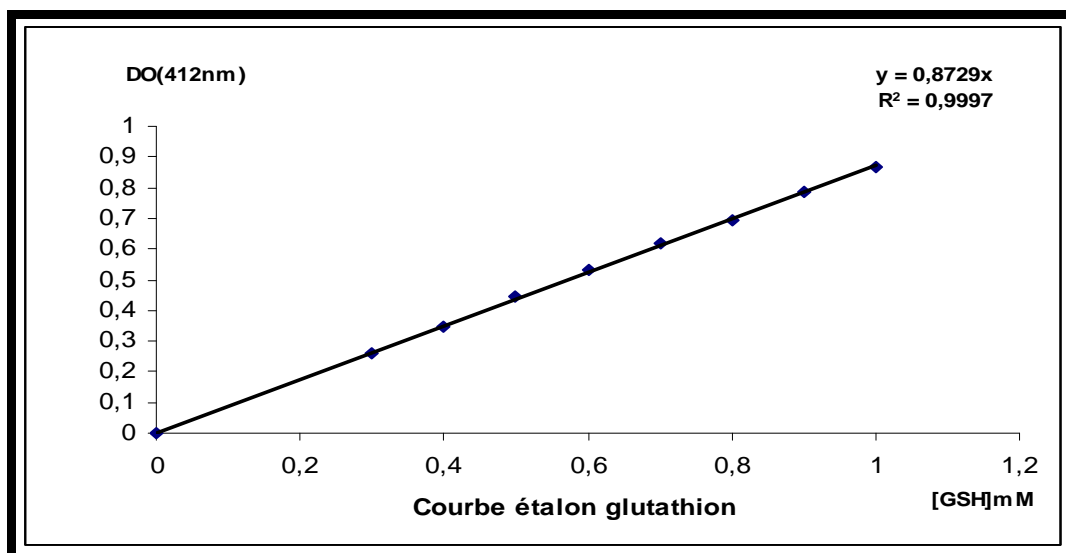
- Milieu de congélation: 20 à 80% de SVF, 5% de DMSO, 75 à 15% de milieu complet

Ce milieu peut être préparé extemporanément ou être stocké à – 20°C.

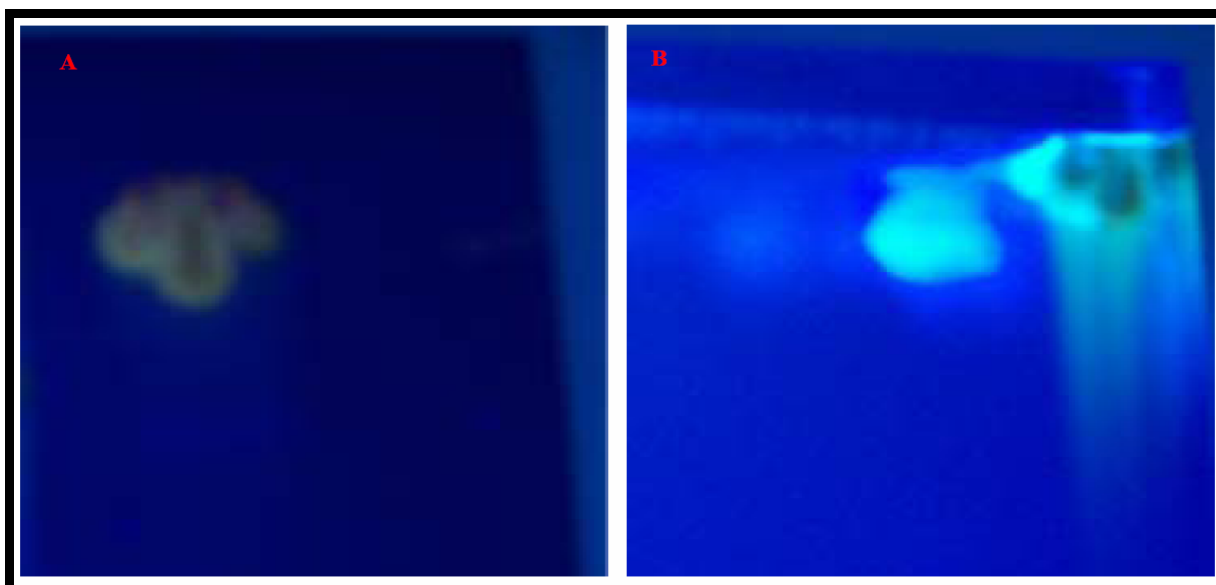
Tous les milieux utilisés avec les cellules (le PBS, la Trypsine, le DMEM...) doivent être préalablement chauffés à 37°C.

2. Courbes d'étalonnage



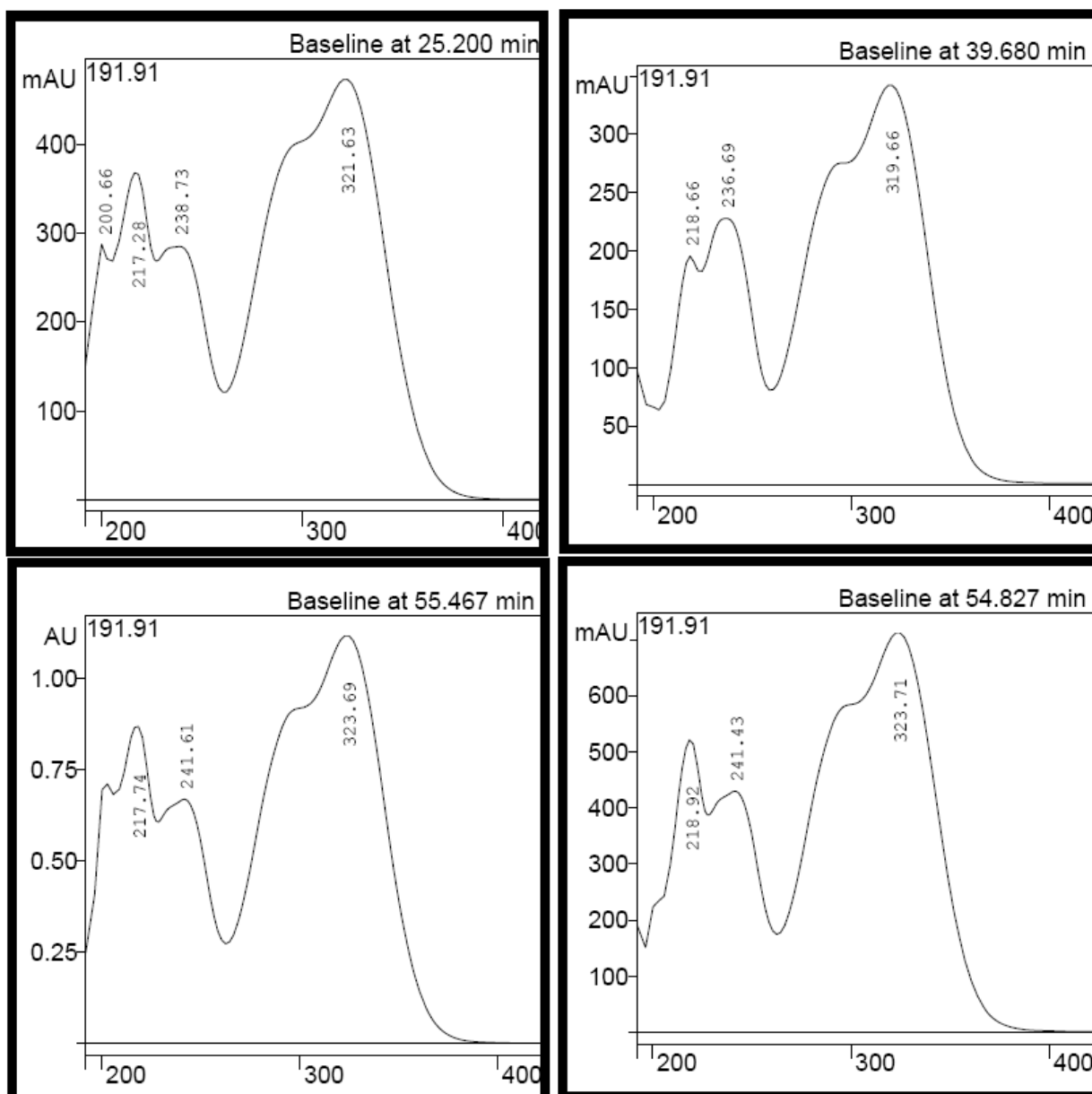


3.Chromatogrammes

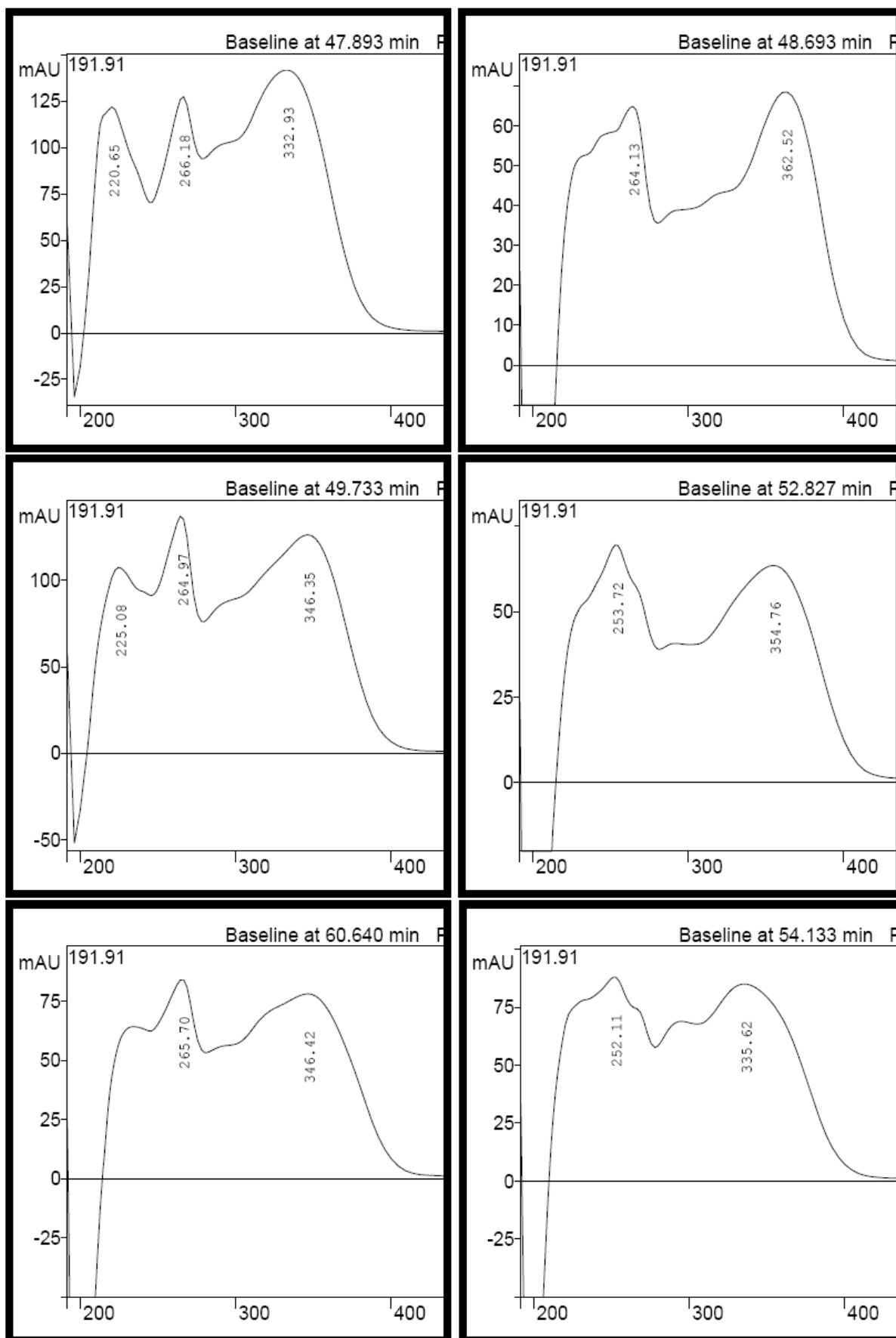


CCM monodimensionnelle (A) et bidimensionnelle de l'extrait de propolis après révélation avec le réactif NEU et sous UV (365nm)

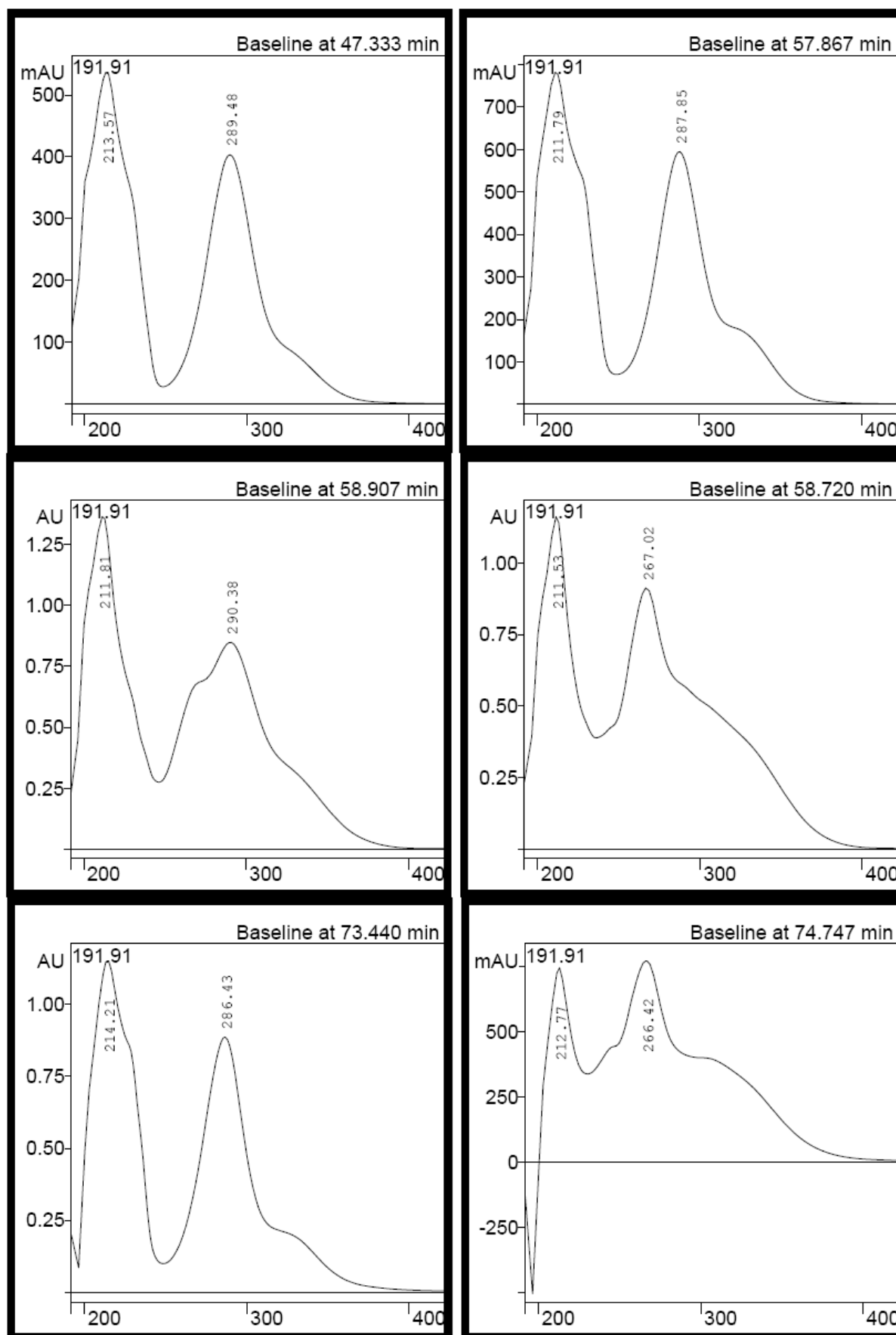
4. Spectres UV



4 spectres UV d'acides phénoliques



6 spectres UV de flavonoïdes



6 spectres UV de chalcones

5. Pourcentage de viabilité des cellules H9c2 exposées à différentes doses de doxorubicine

Temps (heures)	Lipo vides	Doxo 1μM	Doxo 3μM	Doxo 5μM	Doxo 10μM	Doxo 15μM	Doxo 20μM	Doxo 25μM	Doxo 30μM	Doxo 100μM
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	92,06	88,31	91,98	76,13
6	100	99,65	96,21	102,40	92,78	92,10	86,90	85,78	66,09	55,03
9	99,53	88,21	85,53	92,25	94,93	90,14	88,16	74,23	63,55	61,74
20	98,56	83,46	69,10	68,77	69,78	68,10	58,54	48,81	43,03	17,67
48	91,46	8,78	17,94	17,37	14,43	17,03	15,13	13,55	13,46	7,58
96	91,41	4,61	4,89	3,99	3,54	3,72	4,17	4,12	4,53	3,86

***TRAVAUX
SCIENTIFIQUES***

Travaux scientifiques

1. Publications

1^{er} auteur

Alyane M., Benguedouar L., Kebsa W., Bousenane H.N., Rouibah H., **Lahouel M.** Cardioprotective effects and mechanism of action of Polyphenols extracted from Propolis against Doxorubicin toxicity. Pak J Pharm Sci Jul 2008; 21(3):201-209

Impact factor: 0.852

Alyane M., Benguedouar L. **Lahouel M.** Cardioprotective effect of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. Cell stress and chaperones online Aug, 2007 Budapest Meeting Abstracts. 2007. Cell Stress & Chaperones online 12: 2I_01_P

Impact factor: 3.02

Co auteur

Bousenane H.N., Kebsa W., Zellagui A., **Alyane M.**, Rhouati S., **Lahouel M.** Disruption of mitochondrial membrane potential by Ferulenol and Restoration by Propolis extract : A apoptotic role of propolis , Acta Biologica Hungarica 60 (4), 385- 398. 2009.

Rouibah H., Benguedouar L., **Alyane M.**, Bousenane H.N., Kebsa W., **Lahouel M.** The effect of propolis extract supplement on the prevention of heart and vascular risk. Saudi Journal of food and nutrition. 2008, issue 1: 112-119

Benguedouar L., Bousenane H.N., Kebsa W., **Alyane M.**, Rouibah H., **Lahouel M.** Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. Indian Journal of Experimental Biology, 46, february 2008 /112-119

Kebsa W., Rouibah H., Bousenane H.N., Benguedouar L., **Alyane M.**, **Lahouel M.** Long term effect of Algerian propolis flavonoids supplementation on mitochondrial oxidative stress and apoptosis. West African Journal of Pharmacology and Drug Research 2007; 22/23: 16-26

2. Posters

Alyane M., Herpin T., **Lahouel M.**, Barratt G. Remote Loading of Doxorubicin by Transmembrane pH to Reduce toxicity Toward Herats Mitochondria. Second PharmSciFair (Premier European Platform for Advancing Pharmaceutical Sciences) 2-12 June 2009, Nice, France.

Alyane M., **Lahouel M.**, Barratt G. La mitochondrie, Cible Subcellulaire des Anthracyclines. XXIVièmes Journées Scientifiques du G.T.R.V./24th Annual Meeting of the G.T.R.V. (Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation). 7-9 Décembre 2009, Paris, France.

Alyane M., Benguedouar L., **Lahouel M.** Cardioprotective effects of poplyphenols extracted from propolis against Doxorubicin toxicity. Third Cell Stress Society International Congress on Stress

Responses in Biology and Medicine and Second World Conference of Stress. 23-26 August 2007, Budapest, Hungary.

Alyane M., Lahouel M. Effets d'un stress induit par les anthracyclines sur les fonctions cardiaque et hépatique de rat wistar. Symposium Algéro-Français de Pharmacologie sur le Stress. 10-12 Septembre 2006, Jijel, Algérie.

CARDIOPROTECTIVE EFFECTS AND MECHANISM OF ACTION OF POLYPHENOLS EXTRACTED FROM PROPOLIS AGAINST DOXORUBICIN TOXICITY

M ALYANE, L BENGUEDOUAR W KEBSA, HN BOUSSENANE, H ROUBAH AND M LAHOUEL*

Laboratoire de Toxicologie Moléculaire, Faculté des Sciences, Université de Jijel.18000, Jijel, Algérie

ABSTRACT

Propolis is one of the major hive products of bees and is rich in flavonoids, which are known for antioxidant activities. It is well known that the chemical properties of phenolic acids or flavonoids, in terms of the availability of the phenolic hydrogens as hydrogen donating radical scavengers, predict their antioxidant properties.

In this study, the flavonoids scavenging activity of propolis has been exploited to obtain protection against the peroxidative damage in rat heart mitochondria which was induced by the administration of an acute dose of doxorubicin (20mg kg⁻¹, i.p). The peroxidative lesions were evaluated biochemically and biophysically, 24^H after DXR administration.

Abnormal biochemical changes in heart mitochondria from DXR treated rats including a marked increase in both malondialdehyde (MDA) and anion superoxide production; decrease both of respiratory chain ratio (RCR= V3/V4) and P/O.

Pretreatment of rats with propolis extract, given per os (100mg/kg/day) during four days prior to DXR injection, substantially reduced the peroxidative damage in the heart mitochondria: we showed significant reducing both of mitochondrial MDA formation and production of superoxide anion, restoration of RCR and P/O and reducing of rate and the amplitude of mitochondrial swelling. The data demonstrate that antioxidants from natural sources may be useful in the protection of cardiotoxicity in patients who receive doxorubicin and as reported for its claimed beneficial effect on human health by biomedical literature.

Keywords: Propolis; antioxidant; flavonoids; lipid peroxidation; swelling.

INTRODUCTION

Doxorubicin (Adriamycin) is the most widely used anthracycline. It is an analogue of daunorubicin. The major toxicity with use of this compound is an insidious dose-related cardiotoxicity, the precise mechanism of which is unclear (Ratain and Ewesuedo 1999). However, several hypotheses have been put forward foremost of which is that, oxygen free radical formation by doxorubicin (Chopra *et al.*, 1995; Van Acker *et al.*, 1996) enhance the susceptibility of cardiac tissue to lipid peroxidation leading to a progressive dose-related irreversible loss of myofibrils, dilation of the sarcoplasmic reticulum, cytoplasmic vacuolization, swelling of mitochondria, increased number of lysosomes and myocyte necrosis in response to the doxorubicin (Minotti *et al.*, 2004).

One of the reasons why cardiomyocytes would be more susceptible than other tissues to apoptosis induced by doxorubicin is that cardiomyocytes exhibit low levels of antioxidants defences (Andrieu-Abadie, 1999; Minotti *et al.*, 2004).

Propolis, or bee glue, is a dark-coloured resinous substance collected by honeybees from leaf buds and cracks in the bark of various tree species (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006). The chemical composition of propolis is quite complicated and over 150 components have been identified (Marcucci, 1995). Among these compounds flavonoids were suggested to be responsible for the biological activities (Chang *et al.*, 2002).

A cardioprotective effect of propolis extract has been reported (Chopra *et al.*, 1995; Horakova *et al.*, 2001; Siess *et al.*, 2000). However, the mechanism of action of these flavonoids is not well-defined but it is evident that some of their protective effect can be attributed to direct scavenging properties (Van Acker *et al.*, 1996).

Mitochondria, intrinsic pathway of apoptosis, was evoked to explain the protecting effect of flavonoids (Shen and Zhou, 1995; Morin *et al.*, 2001a; Brooks *et al.*, 2002) because several studies have shown that on mitochondria, doxorubicin via reactive oxygen species (ROS) formation, induces apoptosis by favoring cytochrome c release and consequent formation of the apoptosome complex through

*Corresponding author: Tel (+213) 34 47 24 37. Fax (+213) 34 47 48 96, e-mail: lahouelmesbah@yahoo.fr

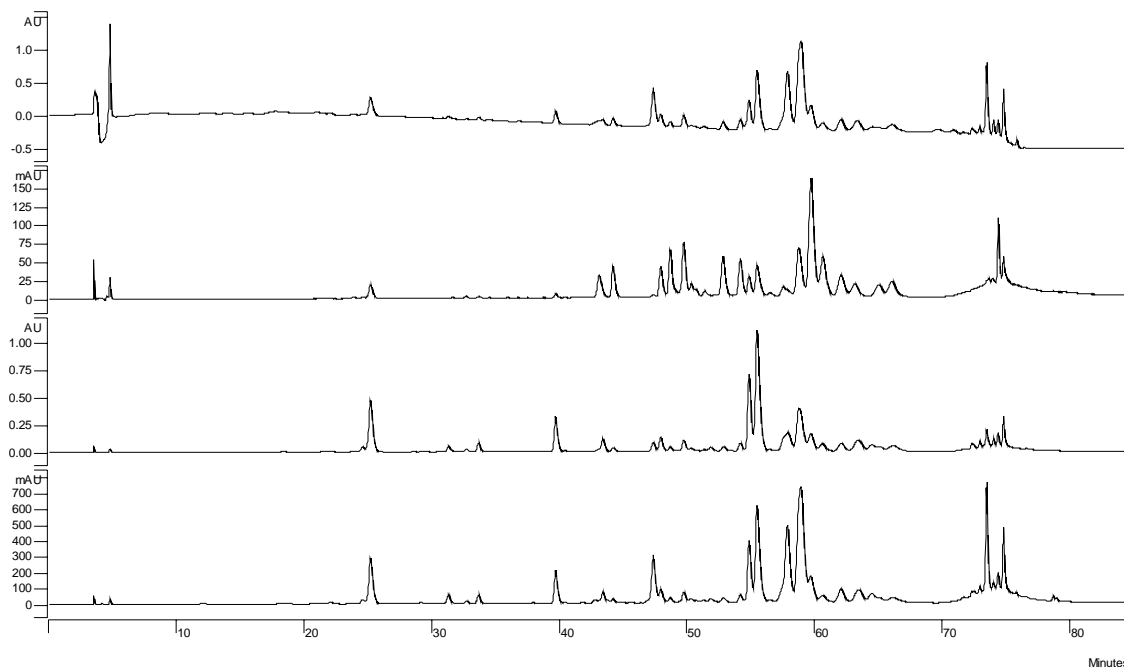


Fig. 1: High performance liquid chromatogram of ethanolic extract of propolis (EEP); flavonoids: 280, 370nm; phenolic acids 325nm.

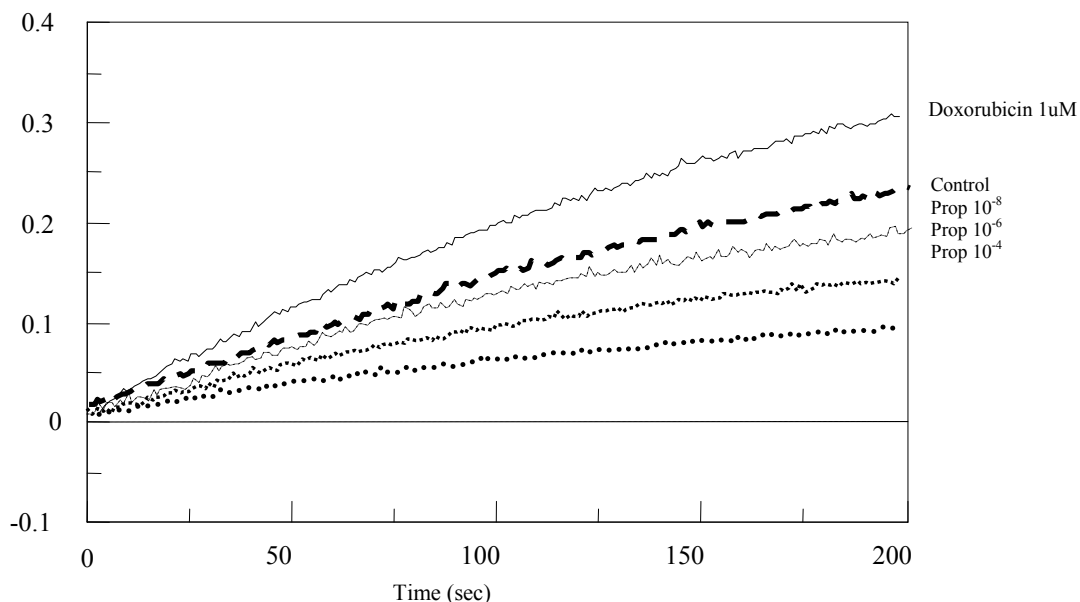


Fig. 2: Effect of doxorubicin 1micro-molar and the propolis extract on the mitochondrial production of superoxide anion *in vitro*.

up-regulation of Bax or down-regulation of Bcl-XL (Minotti *et al.*, 2004).

Recently, we have reported that flavonoids of propolis extract, an effective free radical scavenger, protect liver and the blood tissues in rats treated with anticancer drugs (Lahouel *et al.*, 2004) and we hypothesized that the

protective effect of flavonoids could be due to a direct action on mitochondrial functions.

The present study was undertaken to investigate the effect of the treatment with flavonoids, extracted from propolis, on the mitochondrial function of Wistar rat treated by doxorubicin.

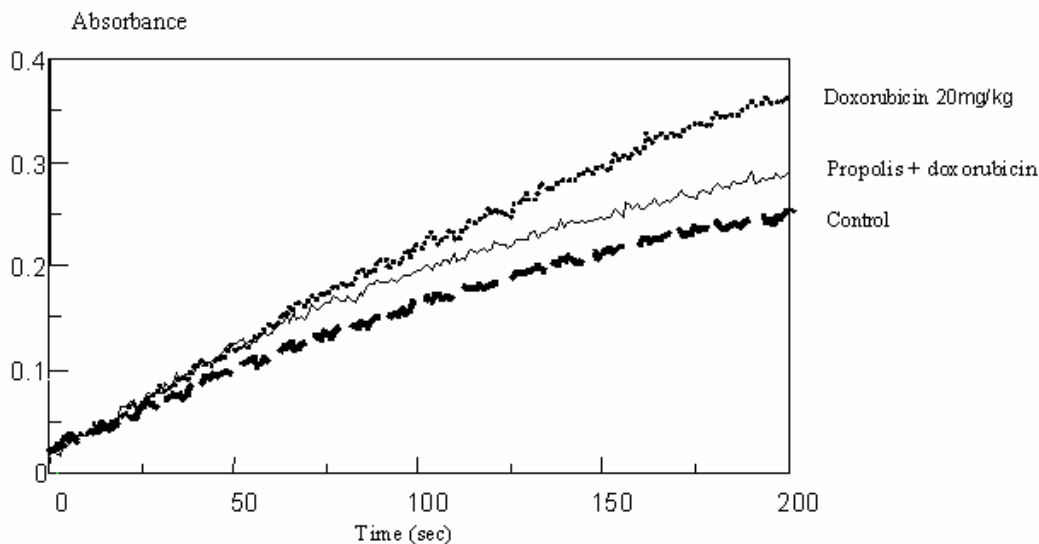


Fig. 3: Effect of doxorubicin 20mg/kg and the propolis extract on the mitochondrial production of super oxide anion *in vivo*.

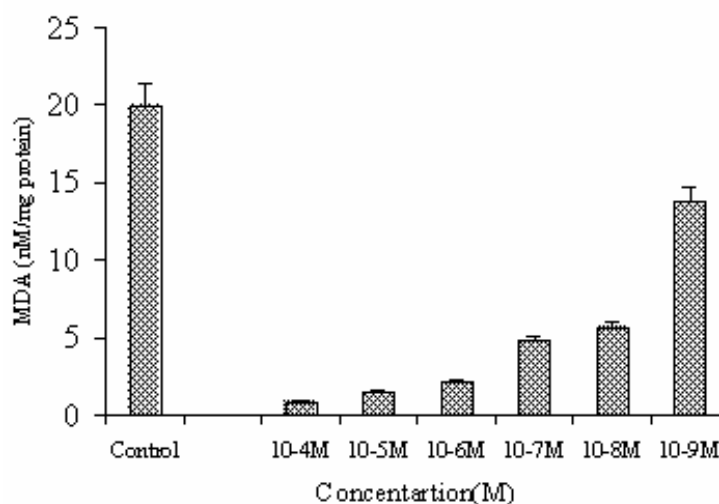


Fig. 4: Variations of heart mitochondria Malondialdehyde (MDA) levels (nMole/mg protein) in the presence of different dilutions (ranged between 10^{-4} and 10^{-9}) of EEP.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Crude propolis was collected from beekeepers of “Coopérative Apicole de Kaous, Jijel (Algérie)” in May-April, 2005. Samples, once received, were stored at 4°C in airtight /dark plastic containers until analysis.

Doxorubicin (Ebewe Unterach, Autriche) was kindly offered by “Centre Anti Cancer, CHU de Constantine”. Sucrose, EGTA, rotenone, malonate, antimycin A, oligomycin, succinate, malate, glutamate, NADH, ADP

were purchased from Sigma Chemical Co. (Algiers, Algeria). KCl, MgCl₂ and KCN were obtained from Prolabo. Tris base (Sigma) and KH₂PO₄ (Sigma) were used. All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

Methods

Extraction of propolis compounds

Propolis extract was achieved by using ethanol and methanol. The propolis is cut into small pieces; dried in alcohol 95° (1g/10ml) for 15 days, filtered and then evaporated to 80°C using a rotary evaporator (Evaporator

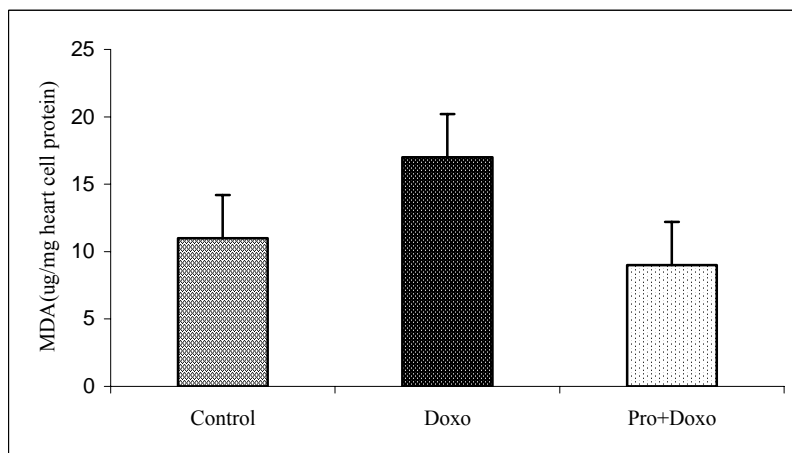


Fig. 5: Effect of polyphenols (propolis extract) on the cardiomyocytes lipid peroxidation induced by doxorubicin 20mg/kg. ***p<0.001.

E100). The residual was retaken using methanol 70° and was let for steeping for one night. After evaporation of the solvent, the produced extract is called; raw extract or propolis extract. Flavonoids rate was determined by reactivity with AlCl₃ method as described by Bankova and Marcucci (2000). Then, the concentration of total flavonoid in propolis extract was expressed as milligrams of quercetin equivalents (QE) per gram dry weight of propolis extract (DWPE), using the following linear equation:

Flavoinid concentration

$$(QE / g DWPE) = \frac{Absorbance}{\epsilon} \times M \times V \times \left(\frac{d}{w}\right)$$

ε: Molar extinction coefficient of quercetin; M: Molar mass of quercetin; d: dilution factor; W: weight of propolis extract.

Analyses of propolis compounds

High performance liquid chromatography of EEP

Flavonoids and other phenolic acids in ethanolic extract of propolis (EEP) were carried out using reversed phase high performance liquid chromatography-diode array detection (RP-HPLC-DAD). The HPLC system was purchased from Varian; DAD was a Varian Prostar, monitoring from 200 to 700 nm wavelengths (Middelburg, The Netherlands). The phenolic compounds in EEP at a concentration of 10 mg/ml were separated on a Nucleodur analytical column, 250 mm x 4.6 mm i.d (Machery-Nagel, Duren, Germany) packed with C₁₈ stationary phase, with a particle size of 5µm.

A linear binary gradient was used. The time of HPLC run was over 70 min. Binary mobile phase consisted of solvent A (trifluoroacetic acid 0.01%) and solvent B (acetonitrile). The separation was obtained by using a gradient starting at 10% of B till 10 min; 10-50 min B

increased to 50% and kept constant till 15 min; 65-70 min B increased at 100% and kept constant till 10 min; successively, the solvent B reached back 10% to reequilibrate the column (washing).

Animals

Female Wistar rats were purchased from Pasteur institute, Algiers. The animals were maintained at 22°C during the experimental period. They have free access for food and water. Animals were divided to three groups: pretreated, untreated, and control (n=8 in each group). Rats were pretreated with an oral administration of propolis extract (100 mg/kg/day) during four days before the injection of adriamycin. The pretreated rats were given an intraperitoneal injection of adriamycin (20 mg/kg) and were sacrificed after 24h. Likewise, rats received intraperitoneal injection of Adriamycin (untreated) or saline solution 0.9% (control).

Isolation of heart mitochondria

Mitochondria were extracted from a homogenate of rat heart by differential centrifugations (Rustin *et al.*, 1994). Briefly, rats (weighing 280-300 g) were killed by decapitation and the heart removed and placed quickly in an ice-bath. The heart was then homogenized (6 ml/g of tissue) in ice-cold isolation medium (Mannitol 225 mM, Sucrose 75 mM, Hepes 5 mM, EGTA 1 mM and albumin 1 mg/ml, pH 7.4 at 37°C) using a Potter-Elvehjem homogenizer. Mitochondria isolation was performed at 4°C without delay using differential centrifugation. The homogenate was centrifuged at 2000 g for 10 min. to remove cell debris and nuclei, and then mitochondria were separated from the supernatant by centrifugation at 12000 g for 5 min. The pellet (mitochondria) was washed and resuspended in a respiratory buffer (KH₂PO₄ 1mM, Sucrose 50 mM, KCl 100 mM, pH 7.4 at 37°C) for measuring mitochondrial enzymatic and respiratory

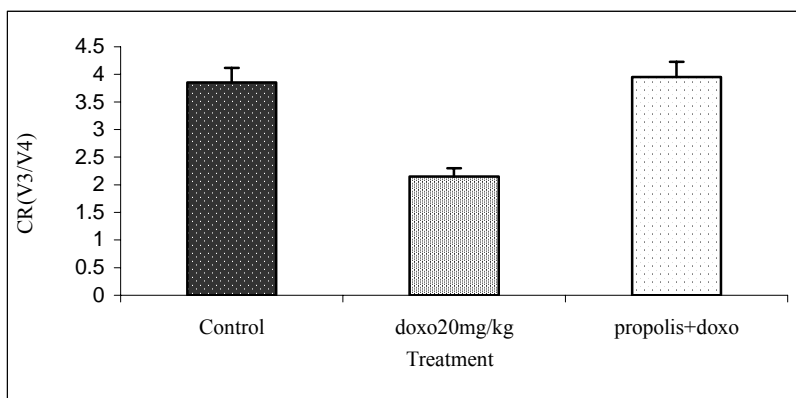


Fig. 6a: Effect of doxorubicin 20mg/kg and the propolis extract on the mitochondrial respiration function and the respiratory control (CR= V3/V4); V3 and V4 are the respiratory rate of states 3 and 4 respectively. The values are mean of three experiments for each animal (n=8).

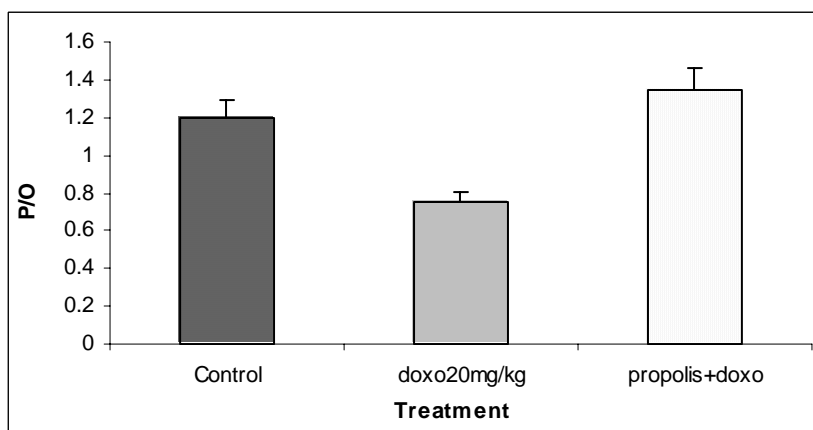


Fig. 6b: Effect of doxorubicin administration alone or in association with propolis extract on the the P/O ratio.

activities. The total protein contents in mitochondrial suspension were determined by the by the Folin-Phenol procedure (Lowry *et al.*, 1951).

Assay of mitochondrial oxygen consumption

Oxygen uptake was determined with a Clark type oxygen microelectrode (Hansatech). Each experiment was carried out as follows: a aliquot of mitochondria suspension equivalent to 1mg/ml were incubated with (or without) the tested drug, incubated 1min. at 37°C in 1000 µl of the respiratory buffer with or without the inhibitors, then the substrate (Pyruvate/malate 6mM) was added and oxygen consumption was checked (State 2). To initiate state 3 respiratory activity, 200 µM ADP was added to the mixture. When all ADP was converted to ATP, the state 4 was measured. The following parameters were determined: the respiratory rates calculated as nmol O₂/mg mitochondrial protein/min and the RCR as State3/State4 ratio.

Mitochondrial Superoxide anion (O₂⁻) assay

Generation of O₂⁻ was achieved using rat heart mitochondria. Reaction mixture contained mitochondria (0.2 mg/ml), 1µM Cyclosporin A and nitroblue tetrazolium (NBT, 100 µM) in 1.2 ml of respiration buffer at 37°C. The reaction was started by adding malate/pyruvate (6 mM) in the assay mixture and the rate of NBT reduction was measured at 560 nm. In absence of mitochondrial substrate (malate/pyruvate), there was no O₂⁻ production.

Free radical scavenging assay

The antioxidant activity of propolis extract was evaluated using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical) assay. Different dilutions of EEP dissolved in ethanol were added DPPH° ethanolic solution (100µM). The bleaching of DPPH° was monitored at 515 nm (Spectrophotometer Hitachi U-300, Tokyo, Japan) against a blank constituted by the EEP solution containing all

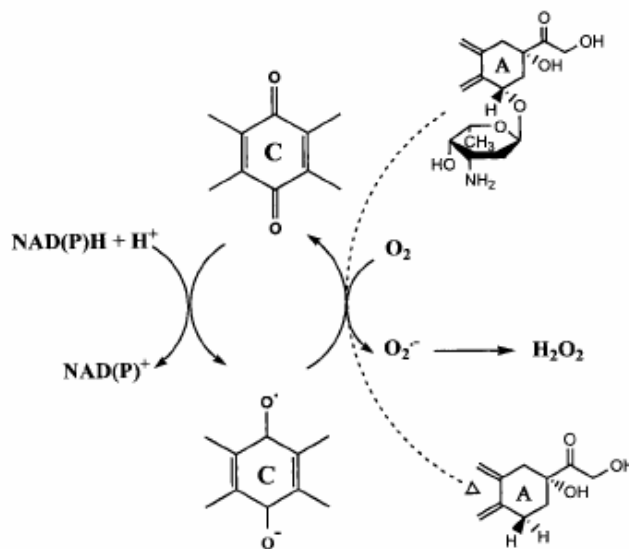


Fig. 7: One-electron redox cycling of anthracyclines (Minotti *et al.*, 2004).

reagents except DPPH°. The percentage of DPPH radical-scavenging activity was plotted against the EEP concentration to determine the amount of extract necessary to decrease DPPH radical concentration by 50% (called EC50).

Lipid peroxidation assessment

Heart Mitochondria were suspended in NaCl 0.9% (0.2mg/ml) and then incubated in a total volume of 1 ml in the presence of Fe²⁺/Fe³⁺ (50µM / 50µM) for 30 min. The reaction was stopped with 1 ml of 3% trichloroacetic acid and 1.5 ml of 1 % thiobarbituric acid was added. The mixture was then heated to 100°C for 30 min and recooled on ice for 5 min. Then, the supernatant was read at 530 nm. Results were expressed as µM MDA / mg of mitochondrial membrane proteins.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were expressed as means ± s.e.m. Statistical comparison between different groups was done using one way analysis of variance (ANOVA) followed by t-test. Significance was accepted at p<0.05.

RESULTS

Chemical of propolis

This study showed that total flavonoid concentration in the raw propolis sample determined by aluminium chloride colorimetric method is equal to 370 mg QE/g DWPE.

HPLC chromatograms of the phenolic fractions of Propolis (fig. 1) indicated the presence of 3 classes of polyphenols: Flavonoids (maximal absorption at 280 and 370nm); Chalcones: dihydrochalcone ($\lambda_{max} = 280-290$ nm)

and Phenolic acids: hydroxycinnamic acids derivatives ($\lambda_{max} = 225$ nm). However, our extracts appears to be rich in flavonoids because the 80% ethanolic extract showed highest absorption at 290 nm, which means that the highest concentration of flavonoids (especially of kaempferide, acacetin and isorhamnetin) (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006) which could explained the in vitro highest free radical scavenging activity of EEP observed in our study because studies by Hodnick *et al.* (1988) showed that the flavonoids with the most hydroxyl groups were most easily oxidized.

Antioxidant effects of polyphenols

The EEP at 10⁻⁴ dilution exhibited the highest free radical scavenging activity when compared with the other two polyphenols, vitamin E and quercetin. This result confirmed the in vivo effect of propolis as related in this study.

In order to evaluate the role of the antioxidant of the polyphenols in heart mitochondria, anion superoxide production was measured in vitro on isolated heart mitochondria. To verify also the active components of propolis in vivo we have compared the effect of propolis extract mixture treatment on anion superoxide production. Fig. 2 shows that in vitro, EEP reduces the production of superoxide anion at dilutions ranged between 10⁻⁴ and 10⁻⁸ on mitochondria incubated with doxorubicin 1µM or not (Control). In vivo, EEP (100 mg/kg) given by oral administration daily for 5 days, starting four days prior to the administration of doxorubicin 20mg/kg reduced also significantly the mitochondrial production of superoxide anion (p<0.01) as described by fig. 3.

By another way, lipid peroxides in rats treated by doxorubicin were assessed. These peroxides are formed

from oxidation of naturally occurring unsaturated fatty acids and rapidly decompose *in vivo* to yield a variety of products, the best characterized of which is malondialdehyde (Myers *et al.*, 1977). Using the procedure outlined in fig. 5, an increased malondialdehyde production was readily detected 24 hours after the intraperitoneal injection of Adriamycin. This level of malondialdehyde formation did not occur in the cardiac tissue of animals treated with an oral administration of EEP (100mg/kg) 4 days to the injection of doxorubicin.

In vitro, the inhibitory effect of propolis extract on lipid peroxidation of heart mitochondrial membranes is observed at 10^{-4} dilution showing it to be more than a ten stronger than that of the positive control, quercetin (fig. 4).

The effect of polyphenols on mitochondrial functions

There is few data on the effect of polyphenols on heart mitochondrial respiratory. So, we have studied different flavonoidal molecules like, quercetin, kaempferol and EEP to elucidate this effect on isolated heart mitochondria. We have also studied the *in vivo* protective effect of EEP on doxorubicin cardiotoxicity. We observed that 20 mg/kg doxorubicin increase the oxygen consumption (state3) and the inhibition of state 4 leads to a decrease of both respiratory chain ratio (RCR= V3/V4) (fig. 6) and P/O. Propolis extract inhibits the effect of doxorubicin showing a restoration of RCR and P/O *in vitro* and *in vivo*.

On the other hand, a massive mitochondrial swelling was observed in cardiac myocytes treated with doxorubicin (Minotti *et al.*, 2004). For this reason, we have tested the capacity of EEP to inhibit mitochondrial swelling. Addition of EEP to a mixture of rat heart mitochondria with 25 μ M calcium inhibits slightly the rate and the amplitude of mitochondrial swelling at 10^{-5} and 10^{-6} dilutions affected by the doxorubicin addition to the medium at a concentration of 1 μ M (data not shown).

Modification of the mitochondrial membrane potential is a signal of apoptotic process. Progesterone and testosterone 0.5 mM have no effect on this parameter at concentrations. However the propolis extract seems to play an original role to restore the loss of the membrane potential induced by doxorubicin 1 μ M (data not shown).

DISCUSSION

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are associated with disease and toxic process. It results from over production of ROS, often leading to peroxidation of membrane phospholipids and production of reactive aldehydes (Hanasaki *et al.*, 1994; Ferrari, 1996;

Korshunov *et al.*, 1997 and Morin *et al.*, 2001a).

The chemical profiles analysis permitted to clear that the nature of the compounds of the propolis extracts is about flavonoids of type flavones and flavonols (Lahouel and Fillastre 2004). These last, have the capacity to capture and to deactivate the free radicals generated by doxorubicin (Hanasaki *et al.*, 1994; Lahouel and Fillastre 2004) and/or by chelating iron (Minotti *et al.*, 2004).

Numerous studies showed that the antineoplastic drugs induced some transformations in the liver by the system Cytochrome P450. These transformations succeed to the formation of highly toxic reactive metabolites for the cell (Lemasters *et al.*, 1998). The toxicity is function of the quantity of free radicals formed and of the cellular reserve in glutathione and the available glutathion-s-transferases to assure the detoxification. Inner mitochondria membrane is considered as targets of toxic process during chemotherapy, leading to ROS production (Morin *et al.*, 2001b; Green and Kroemer 2004). Indeed, most of chemotherapeutic agents (doxorubicin, cyclophosphamid...) are metabolized in the liver by the cytochrome P450 (Lemasters *et al.*, 1998) and the reactive intermediates which are formed are responsible for apoptotic process and cell toxicity (Ichikawa *et al.*, 2002). The treatment of Wistar rats with a single dose of 20mg/kg/ip doxorubicin showed some effects in the heart mitochondria functions especially: the drug decreases the respiratory control rate and increases the superoxide anion and the MDA production. These biochemical abnormalities did not occur in heart mitochondria and cardiac tissue of animals treated with oral administration of EEP (100mg/kg/day) five days prior to the intraperitoneal injection of doxorubicin (20mg/kg), we observed: a restoration of the RCR, a decrease of superoxide anion production and an inhibition of the lipid peroxides formation. The same effects are observed *in vitro* on heart mitochondria setting in presence of increasing concentrations of propolis extract. These results suggested that lipid peroxidation, superoxide anion and decrease of RCR may play an important role in adriamycin toxicity. These results permitted also to clarify the prevention mechanism of propolis extract against doxorubicin cardiotoxicity.

Indeed, in cardiac tissue, addition of one-electron to the quinone moiety in ring C of doxorubicin and other anthracyclines has long been known to result in formation of a semiquinone that quickly regenerates its parent quinone by reducing oxygen to reactive oxygen species like superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Minotti *et al.*, 2004). During this cycle the semiquinone can also oxidize with the bond between ring A and daunosamine, resulting in reductive deglycosidation and formation of 7-deoxyaglycone (fig.

7). Due to their increased lipid solubility, aglycones intercalate into biologic membranes and form ROS (O_2^- , H_2O_2) in the closest proximity to sensitive targets (Gille and Nohl 1997 and Licata *et al.*, 2000). This ROS production has been proposed as a mechanism for the amplification of mitochondrial dysfunction by doxorubicin (Gille and Nohl 1997). For this reason, we have tested the impact of EEP on the suppression of superoxide anion production in cardiac tissue after adriamycin administration. From fig. 4, it is apparent that prior treatment of the animals with EEP diminishes the ability of adriamycin to induce ROS production.

Collapse of membrane potential and swelling are among mitochondrial perturbation observed in heart mitochondria isolated from animals treated with doxorubicin (Minotti *et al.*, 2004). Koller and Haid (2005) have suggested that the restoration of the mitochondria transmembrane potential may be a way in the prevention of doxorubicin cardiotoxicity. Keeping this information in mind, we tested the capacity of EEP to restore potential membrane and to inhibit mitochondrial swelling. On both cases EEP, on the one hand, is able to restore the fall of membrane potential (unpublished data), which disruption has been an established indicator of mitochondrial damage in the progression of apoptosis (Ye *et al.*, 1999); on the other hand, it inhibits slightly the rate and the amplitude of mitochondrial swelling at 10^{-5} and 10^{-6} dilutions. We have established also that the incubation of rabbit cardiomyocytes with propolis extract $10^{-4}M$ can induce a total protection from apoptosis induced by doxorubicin $1\mu M$ (results not shown). The results showed a significant decrease in the caspase 3 and 9 activities.

CONCLUSION

The mitochondria seems to play a fundamental role as well in the toxicity of the doxorubicin by the formation of ROS that a protective role when it is protected by the propolis polyphenols. It is evident from the present work that the Algerian propolis is a very interesting and might be able to solve the problem of the doxorubicin cardiotoxicity. As suggested by Samet *et al* (2007), propolis can open perspectives in the treatment of human health.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Filali, CAC-CHU of Constantine for the supply of doxorubicin drug and beekeepers of Coopérative Apicole de Kaous (Jijel) for propolis sample sourcing.

REFERENCES

Andrieu-Abadie (1999). Le céramide à l'origine de la cardiotoxicité de la doxorubicine? *Med. Sci.*, **15**: 1322-1324.

- Bankova V and Marcucci MC (2000). Standardization of propolis: Present status and perspectives. *Bee World*, **81**: 182-188.
- Brooks PS, Digeress SB, Parks DA and Darley-Usmar V (2002). Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**: 1220-1228.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM and Chern JC (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *JFDA.*, **10**: 178-182.
- Chopra S, Pillai KK, Husain SZ and Girdl DK (1995). Propolis Protects against doxorubicin-induced myocardiopathy in rats. *Exp. Mol. Pathol.*, **62**: 190-198.
- Cotelle N (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**: 569-590.
- De Matteis F (1994). The role of cytochrome P₄₅₀ in drug metabolism and toxicity. CRC Press Inc., New York, pp.81-92.
- Ferrari R (1996). The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**: S1-S10.
- Gazzani G, Papetti A, Daglia M, Berte F and Gregotti C (1998). Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsomes and the effect of thermal treatment. *J. Agric. Food. Chem.*, **46**: 4123-4127.
- Gille L and Nohl H (1997). Analyses of the molecular mechanism of Adriamycin induced cardiotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**: 775-782.
- Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A and Fernández-Gutiérrez A (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**: 1220-1234.
- Green DR and Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, **305**: 626-629.
- Hanasaki Y, Ogawa S and Fukui S (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical. Biol. Med.*, **16**: 845-850.
- Hodnick WF, Milosavljevic EB, Nelson JH and Pardini RS (1988). Electrochemistry of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.*, **37**: 2607-2611.
- Horakova K, Sovcikova A, Seemannova Z, Syrova D, Busanyova K, Drobna Z and Ferencik M (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, **15**: 30, 650-64.
- Ichikawa H, Satoh K, Tobe T, Yasuda I, Ushio F, Matsumoto K, Endo K and Ookubo C (2002). Free radical scavenging activity of propolis. *Redox Rep.*, **7**: 347-350.
- Korshunov SS, Skulachev VP and Starkov AA (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS. Lett.*, **416**: 15-18.

- Lahouel M, Boulkour S, Segueni N and Fillastre JP (2004). Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Path. Biol.*, **52**: 314-322.
- Lahouel M and Fillastre JP (2004). Role of flavonoids in the prevention of hematotoxicity due to chemotherapeutic agents. *Haema.*, **7**: 313-320.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA and Herman B (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1366**: 177-196.
- Licata S, Saponiero A, Mordente A and Minotti G (2000). Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**: 414-420.
- Lowry O, Rosebrough J, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Marcucci MC (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, **26**: 83-99.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, **56**: 185-229.
- Morin D, Barthelemy S, Zini R, Labidalle S and Tillement JP (2001a). Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Letters*, **495**: 131-136.
- Morin D, Hauet T, Spedding M and Tillement JP (2001b). Mitochondria as a target for antiischemic drugs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **1**: 1254-1280.
- Myers CE, McGuire EWP, Liss RH, Grotzinger K and Young RC (1977). Adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, **197**: 165-167.
- Park YK, Ikegaki M, Matias of Alencar S (2000). Classificação das propolis Brasileiro a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce.*, **58**: 158-163.
- Ratain MJ and Ewesuedo RB (1999). Cancer chemotherapy. In: Vokes EE and Golombs HM (Eds). *Oncologic therapies*. Springer-Verlag, Berlin, pp.76-83.
- Rustin P, Chrétien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotig A, Saudubray JM and Munnich A (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta.*, **228**: 35-51.
- Samet N, Laurent C, Susarla SM and Samet-Rubinsteen N (2007). The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study". *Clin. Oral Investig.*, **11**(2): 143-147.
- Shen JG and Zhou DY (1995). Efficiency of Ginkgo biloba extract (EGB 761) in antioxidant protection against myocardial ischemia and reperfusion injury. *Biochem. Biol. Int.*, **35**: 125-134.
- Siess MH, LeBon AM, Canivenc-lavier MC and Suschetet M (2000). Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *Biofactors*, **12**: 193-198.
- Silva MM, Santos MR, Caroço G, Rocha R, Justino G and Mira L (2002). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radic. Res.*, **36**: 1219-1227.
- Tokarska-Schlattner M, Wallimann T and Schlattner U (2006). Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin. *C. R. Biol.*, **329**: 657-668.
- Van Acker SABE, Van Den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJF and Bast A (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**: 331-342.
- Ye J, Wang S, Leonard SS, Sun Y, Butterworth L, Antonini J, Ding M, Rojanasakul Y, Vallyathan V, Castranova V and Shi X (1999). Role of reactive oxygen species and p53 in chromium (VI)-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **274**: 34974-34980.

RÉSUMÉ

La cardiotoxicité de la doxorubicine se traduit par une insuffisance cardiaque congestive irréversible souvent mortelle. Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont que partiellement connus et semblent complexes et distincts du mécanisme anticancéreux impliquant un stress oxydatif. L'objectif de notre recherche est l'étude des mécanismes sous jacents à la cardiotoxicité de la doxorubicine. L'étude a été réalisée *in vivo* par le traitement de rats wistar par la doxorubicine encapsulée dans des liposomes ou nue à différentes doses (10, 20 et 30 mg/kg) en présence ou en absence de flavonoïdes de la propolis et *in vitro* sur des cellules H9c2 traitées par les mêmes médicaments. En plus du statut oxydant, différents paramètres mitochondriaux (CR, swelling, bioénergétique...) ont été évalués. L'étude est complétée par les tests MTT et LDH.

In vivo, la doxorubicine entraîne un stress oxydatif plus prononcé que la doxorubicine liposomale, une inhibition de l'activité cytochrome c oxydase, une déplétion du glutathion tissulaire concomitante à une augmentation de la production de ROS, un gonflement de mitochondries. Le dysfonctionnement mitochondrial à l'origine de la cardiotoxicité est confirmé par le test MTT et le test LDH sur cellules H9c2 pour des doses de 10 à 30µM.

En conclusion, à doses élevées la doxorubicine serait responsable d'une cytotoxicité par nécrose et à faibles doses par apoptose impliquant la mitochondrie. Ces effets délétères, sont reversés par les flavonoïdes de la propolis par action au niveau du pore de perméabilité membranaire (MPPT).

Mots clés : *Doxorubicine ; Cardiotoxicité ; Doxorubicine ; H9c2 ; Liposomes; ROS ; Stress oxydant ; MTT..*

ABSTRACT

The doxorubicin cardiotoxicity leads in irreversible congestive heart failure that is often fatal. The molecular mechanisms involved are only partially known and are complex and different from the anticancer mechanism involving oxidative stress. The aim of our research is to study the mechanisms underlying the cardiotoxicity of doxorubicin. The study was conducted *in vivo* by treatment of Wistar rats with doxorubicin encapsulated in liposomes or naked at different doses (10, 20 and 30 mg / kg) in the presence or absence of propolis extract and *in vitro* on H9c2 cells treated with the same drugs. In addition to the oxidative status, different mitochondrial parameters (CR, Swelling, bioenergy ...) were evaluated. The study is complemented by MTT and LDH tests.

In vivo doxorubicin causes oxidative stress more pronounced than liposomal doxorubicin. A activity inhibition cytochrome c oxidase depletion of tissue glutathione concomitant with increased production of ROS, swelling of mitochondria are observed. The mitochondrial dysfunction at the origin of the cardiotoxicity is confirmed by the MTT assay and LDH test on H9c2 cells at doses of 10 to 30µM. In conclusion, high doses of doxorubicin would be responsible for cytotoxicity by necrosis and apoptosis by low doses involving the mitochondria. These disorders are prevented by flavonoids acting at the membrane permeability pore (MPPT).

Keywords: *Cardiotoxicity; Doxorubicin; H9c2; Liposomes; Oxidative Sstress; ROS, MTT.*

يؤدي الدوكسوروبيسين إلى قصور القلب الاحتقاني المميت. الآليات الجزيئية للتسمم القلبي معروفة جزئياً وتبدوا معقدة ومختلفة عن الآلية

بالإضافة إلى تقدير بعض المعايير الميتوكوندرية (التنفس، تورم ، الطاقة الحيوية...) و

LDH و MTT.

بينت الدراسة سمية الدوكسوروبيسين مقارنة مع الدواء المغلف بحيث أظهرت هذه الدراسة زيادة في الجذور الحرة المؤكسدة و في الإجهاد الميتوكوندريا

الكلمات المفتاحية: الدوكسوروبيسين، التسمم الي، الليبوزومات ، الإجهاد التأكسدي الجذور الحرة الأوكسجينية. التسمم القلبي