

BC 2012028

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Jijel

جامعة سطيف الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم التبريد : 1168



Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire

De fin d'études en vue de l'obtention du diplôme

D'études supérieures (D.E.S)

Option : Biochimie

Thème

**Anthracyclines: cytotoxicité, cardiotoxicité
et radicaux libres oxygénés**

Membre du Jury :

Examineur : Melle BOUSSNANE Hanane Nadia

Encadreur : Mr ALYANE Mohamed

Présenté par :

Melle BAHY Hayette

Melle DJINI Fahima

Melle BOUCHERGUINE Nabila



Promotion Juin 2008

Remerciement

Au terme de ce travail :

Nous tenons à remercier tout d'abord Dieu le tous puissant qui nous a donné la capacité nécessaire, la forte volonté et la patience afin d'accomplir ce travail et qui nous a toujours guider vers le bon chemin.

Puis, nous tenons à coeur à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur M^R Alyane Mohamed qui nous a suivi tout au long de ce travail et à les remercier infiniment pour leur conseils avisés, pour leur disponibilité continue et pour leur encadrement déterminé. Merci de nous avoir partager vos connaissances avec tant d'enthousiasme, de patience et de gentillesse.

Nous remercions vivement notre examinatrice Melle Bousnane Hanane Nadia d'avoir accepté de faire partie de notre jury et qui a sacrifié de son temps afin d'examiner et d'évaluer ce travail.

Nos plus vifs remerciements à tous les enseignants du département de biologie de l'université de Jijel et en particuliers ce qui nous a transmis leur savoir durant les quatre ans. Nous leurs témoignons toute notre reconnaissance.

Nous serions bien sur jamais arrivée là sans l'aide et le soutien de nos familles. Merci à nos parents pour avoir toujours cru en nous. Merci de nous avoir soutenue dans cette voie, merci de votre présence de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci pour tout. Nous espérons vous rendre le bonheur que vous nous apportez.

*Bahi Hayette
Djini Fahima
Boucherguine Nabila*

Sommaire

INTRODUCTION.....	01
-------------------	----

Chapitre I : Généralités

1. Historique	02
2. Définition.	02
3. Structure moléculaire	02
4. Famille des anthracyclines	04
5. Utilisation des anthracyclines.	07
6. Pharmacologie	08
6.1. Voie d'administration	08
6.2. Demi-vie.....	08
6.3. Métabolisme (biotransformation)	08
6.4. Elimination	09

ChapitreII : Cytotoxicité des anthracyclines

I.Cytotoxicité des anthracyclines	10
I. 1. Principaux mécanismes de cytotoxicité des anthracyclines	10
I. 1.1. <i>Effet intercalant</i>	10
I.1.2. <i>Effet antitopoisomérase II</i>	12
I.1.2.1. Topo isomérase	12
I.1.2.2. Anthracyclines et topoisomérase	12
I.1.3. <i>Génération des radicaux libres</i>	13
I.1.4. <i>Peroxydation lipidique</i>	14
I.1.5. <i>Interférences au niveau de l'hélicase</i>	14
I.1.6. <i>Induction de l'Apoptose</i>	15
I.2.7. <i>Arrêt du cycle cellulaire</i>	15

I.2.8. Autres mécanismes	15
II. Apoptose et Nécrose	16
II.1. Apoptose	16
II.1.1. Mécanisme moléculaire de l'apoptose	16
II.1.1.1. La voie extrinsèque	18
II.1.1.1.1. Mécanisme moléculaire	18
II.1.1.2. La voie intrinsèque	19
II.2. La nécrose ou mort cellulaire accidentelle	21

Chapitre III : La Cardiotoxicité des anthracyclines et radicaux libres

1. Les radicaux libres	24
1.1. Réactivité des radicaux libres	24
1.2. Formation de radicaux libres	24
1.2.1. Dérivés d'oxygène ou ROS	24
1.2.2. Voies de génération de ROS	25
a. Voies enzymatiques.....	25
b. Voies non enzymatiques.....	27
➤ Réaction de Fenton	27
➤ Réaction de Haber –Weiss	27
➤ Autres réactions	27
1.3. Les effets des radicaux libres.....	28
1.3.1. Les effets des radicaux libres sur les oses	28
1.3.2. Les effets des radicaux libres sur les lipides	28
1.3.3. Les effets des radicaux libres sur les protéines	29
1.3.4. L'effet des radicaux libres sur les acides nucléiques.....	30
2. Cardiotoxicité des anthracyclines.....	30
2.1. Rôle du Fer dans la cardiotoxicité	31
2.2. Sensibilité du cœur aux anthracyclines	33

2.2.1. Richesse du cœur en mitochondries.....	33
2.2.2. Faibles teneur en défenses antiradicalaires	33
3. Anthracyclines et mitochondrie	33
3.1. Dommages d'ADN mitochondriaux induits par les ROS	34
3.2. Modification morphologiques de la mitochondrie	34
3.2.1. Gonflement mitochondrial	35
3.2.2. Contrôle respiratoire.	35
a. Définition	35
b. Etats du contrôle respiratoire	35
c. Anthracyclines et respiration mitochondriale	36
➤ Interaction doxorubicine et complexes de Green	36
➤ Interaction avec les états du contrôle respiratoire.....	36
CONCLUSION.....	38

Références bibliographiques

Liste des tableaux

Tab.1. comparaison biochimique et morphologique de l'apoptose et nécrose.....	23
Tab.2. les effets de la doxorubicine sur les enzymes respiratoires	37

Liste des figures

Fig.1. structure comparées des anthracyclines.....	03
Fig.2. structure de deux agents d'intercalation, le bromure d'ethidium et la doxorubicine et leurs effets sur la structure de l'ADN.....	11
Fig.3. la réduction d'un cycle d'antracyclines par un électron.....	14
Fig.4. l'apoptose-suicide cellulaire actif.....	17
Fig.5. les deux voies d'apoptose.....	20
Fig.6. récepteurs déclenchant la mort cellulaire.....	20
Fig.7. nécrose-mort cellulaire accidentelle.....	22
Fig.8. les différents degrés d'oxydation de l'élément oxygène.....	25
Fig.9. origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactifs de l'oxygène en biologie.....	26
Fig.10. mécanisme radicalaire provoqué par le radical libre hydroxyle sur un acide gras.....	29
Fig.11. les deux étapes d'hydrolyse de dexrazoxane en diacide-diamide.....	32

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique.

ADN mt : acide désoxyribonucléique mitochondriale

ADP : Adénosine diphosphate.

APAF-2 : Apoptotic Protease Activating Factor 1.proteine 2 facteur activant les proteases apoptotiques.

ATP : Adénosine Triphosphate.

Bad : Bcl-2 antagonist of cell death protein. Proteine de mort cellulaire antagoniste domaines homologie à bcl-2.

Bax : Bcl-2 associated X protein. Proteine X associée à Bcl-2.

Bcl-2 : B cell lymphoma protein 2.proteine 2 de lymphome des cellules B.

CAD : caspase-3- activated DNase.

Caspase : Cystein Aspartate protease . protease cysteine aspartate.

DD : Death Domain. Domaine de mort.

DED :death effector domain.

DEVD : Acide Aspartique-Acide glutamique- Valine-Acide Aspartique.

DR : Death Receptor. Recepteur de mort.

EDTA : Ethylen Diamide Tetra Acétique.

FADD : Fas-Associated Death Domain.

ICAD : Inibitor caspase-3 Activated DNase.

MPT : Transition Mitochondrial de Perméabilité.

NADH : Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide.

O₂ : Oxygène moléculaire.

ROS : Reactive Oxygen Species . espèces réactives d'oxygène.

SOD : Superoxyde Dismutase.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha. Facteur alpha de Nécrose des Tumeurs.

YEVD : Tyrosine-Acide glutamique-Valine-Acide aspartique.

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

Définis par leur capacité de tuer des cellules tumorales, les agents cytotoxiques anticancéreux possèdent l'index thérapeutique le plus faible de toutes les classes de médicaments prescrites en médecine. Ils appartiennent à des classes très diverses de molécules dont l'utilisation implique la compréhension des mécanismes qui en régulent l'efficacité et la toxicité : outre leur mode d'action ce sont en premier lieu la pharmacocinétique et la pharmacodynamique. Ces substances introduites peu à peu au cours des 5^{ème} et 6^{ème} décennies du XXème siècle, se sont progressivement imposées vers les années soixante dix dans le cadre de nouvelles indications et de stratégies multidisciplinaires de plus en plus complexes [1].

D'autre part, les anticancéreux cytotoxiques agissent sur différents stades de la multiplication cellulaire en interférant avec la synthèse des acides ribonucléique et desoxyribonucléiques ou en bloquant les mécanismes de la division cellulaire. Leur sélectivité, relative est attribuée aux perméabilités différentes des membranes cellulaires .

Malheureusement, les médicaments anticancéreux n'agissent pas uniquement sur les cellules tumorales. Ils sont également toxiques pour les cellules normales, à renouvellement rapide et pour certains organes [2].

Parmi les médicaments anticancéreux cytotoxiques les plus utiles, les anthracyclines qui jouent un rôle très important dans le domaine médical, étant donné leur large spectre d'activité. Cependant, leur cardiotoxicité cumulative limite leur utilisation [3].

La réduction de la dose thérapeutique comme moyen de prévenir ou de retarder leur toxicité cardiaque conduit inéluctablement à la réduction des chances de curabilité de la tumeur.

Les connaissances préalables sur les mécanismes de la cancérologie impliquant les ROS, sont très modestes chez le public, il nous a semblé préférable de reprendre à un niveau assez élémentaire les notions de radicale libre, d'apoptose, de nécrose et leur rôle dans la cardiotoxicité afin de mettre une information utile, pertinente et concise entre les mains des gens intéressés.

Chapitre I : Généralités

1. Historique

Au cours des années soixante une nouvelle classe d'antibiotique à activité anti-tumoral a été découverte. Le nom d'anthracycline leur sera donné. La première anthracycline était la daunorubicine, active surtout dans les hémopathies malignes (Leucémies et lymphomes), fut isolée au début des années soixante à partir de pigments produits par *Streptomyces peucetius* alors que la doxorubicine ne fut isolée que quelques années plus tard en Italie (1971). Elle est considérée comme le chef de fil de cette famille d'anticancéreux.

D'autre part, deux objectifs ont guidé la recherche de nouvelles anthracyclines : découvrir des molécules ne possédant ni chimiorésistance croisée avec les premières, ni toxicité pour le cœur. Ainsi, plus de sept cents molécules ont été isolées, soit à partir de souches de *Streptomyces peucetius*, soit par modification chimique des cycles, de la chaîne latérale et de la partie osidique des premières anthracyclines, mais seules quelques unes sont devenues des médicaments : Epirubicine, la pirarubicine, la zorubicine, l'aclarubicine et l'idarubicine. Le suffixe rubicine rappelle leur couleur rouge intense [4].

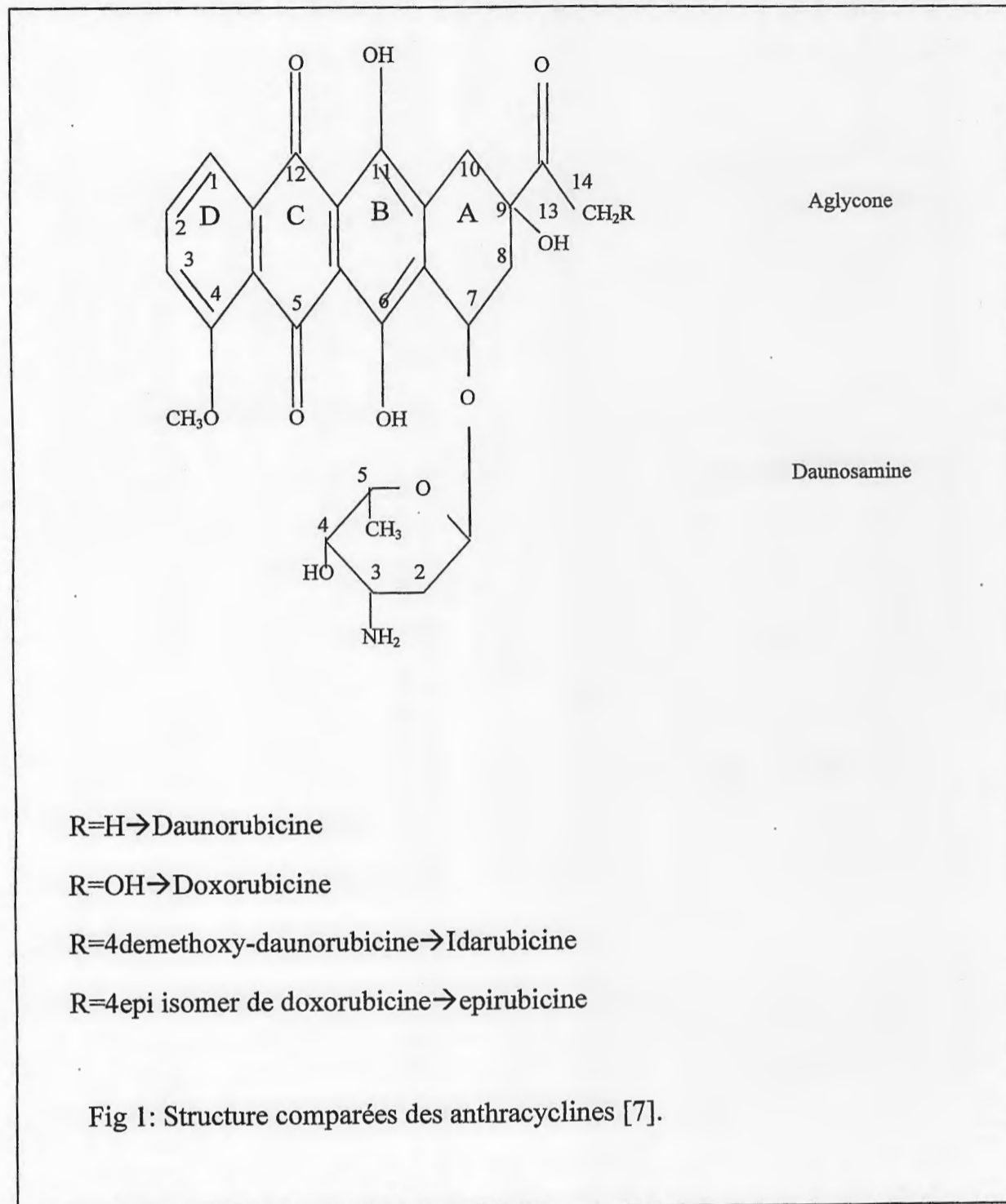
2. Définition

Les anthracyclines sont une famille de médicaments anticancéreux d'origine naturelle, isolés comme des antibiotiques de micro-organismes (actinobactéries) du genre *Streptomyces*. La doxorubicine constitue l'anticancéreux majeur de la classe des anthracyclines possédant un spectre d'action très large, elle est active dans les adénocarcinomes et les sarcomes : on la considère comme le chef de fil de ces médicaments [5].

3. Structure moléculaire

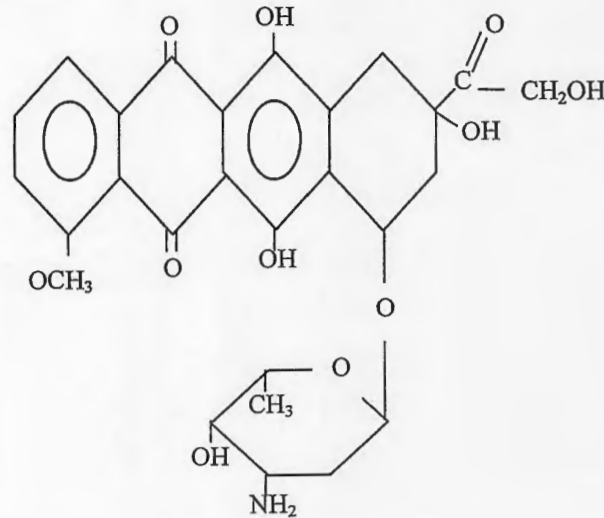
Tous les médicaments de cette famille ont tous en commun une structure de base comportant un aglycone pigmenté, un sucre aminé en dérivation et une chaîne latérale. La partie aglycone ou génine consiste en une structure polyaromatique composée par 4 cycles accolés (tétracyclines) désignés par les lettres A, B, C, et D. Le sucre aminé ou daunosamine est attachée par une liaison glycosidique au carbone 7 du cycle A. En fin, les agents cytotoxiques de cette famille ont tous une structure quinone et hydroquinone,

qui leur permet de fonctionner comme accepteurs et donneurs d'électrons. Les structures moléculaires des diverses anthracyclines utilisées en clinique sont présentés dans la figure1 [6].



4. Famille des anthracycline :**4.1. Doxorubicine : [3]**

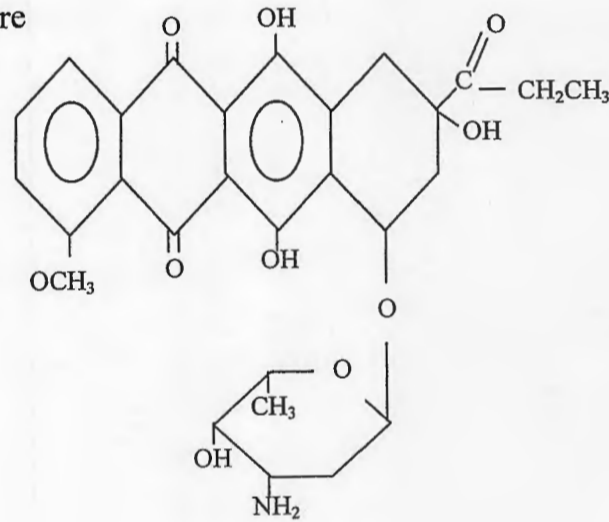
- Posologie : 30 à 60 mg/m² toutes les 3 à 5 semaines
- Structure



- Toxicité cardiaque : survient après une dose cumulative supérieure à 550 mg/m²

4.2. Daunorubicine : [3]

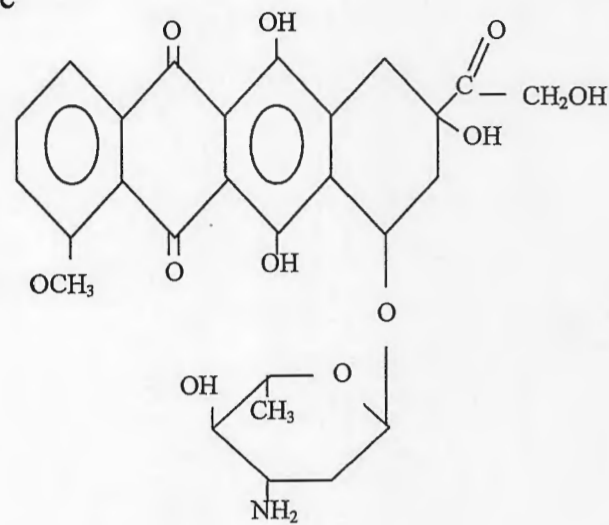
- Posologie : 180 à 400 mg/m² (60-100 mg/m²/j pendant 3 à 5 j)
- Structure



- Toxicité cardiaque : survient après une dose cumulative supérieure de 600 mg/m²

4.3. Epirubicine [8]

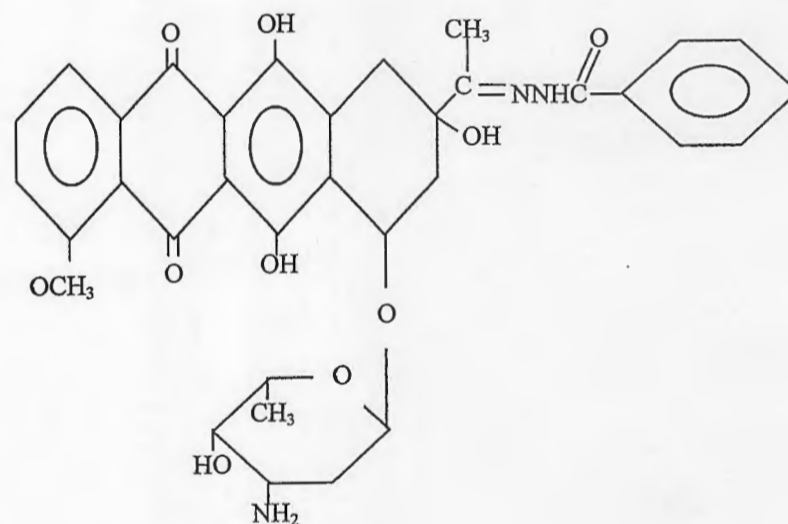
- Posologie : 50 - 75 mg/m² toutes les 3-4 semaines
- Structure



- Cardiotoxicité : survient après une dose cumulative supérieure de 850 mg/m²

4.4. Zorubicine : [3]

- Posologie : 120-200 mg/m²/j pendant 3 à 5 j
- Structure

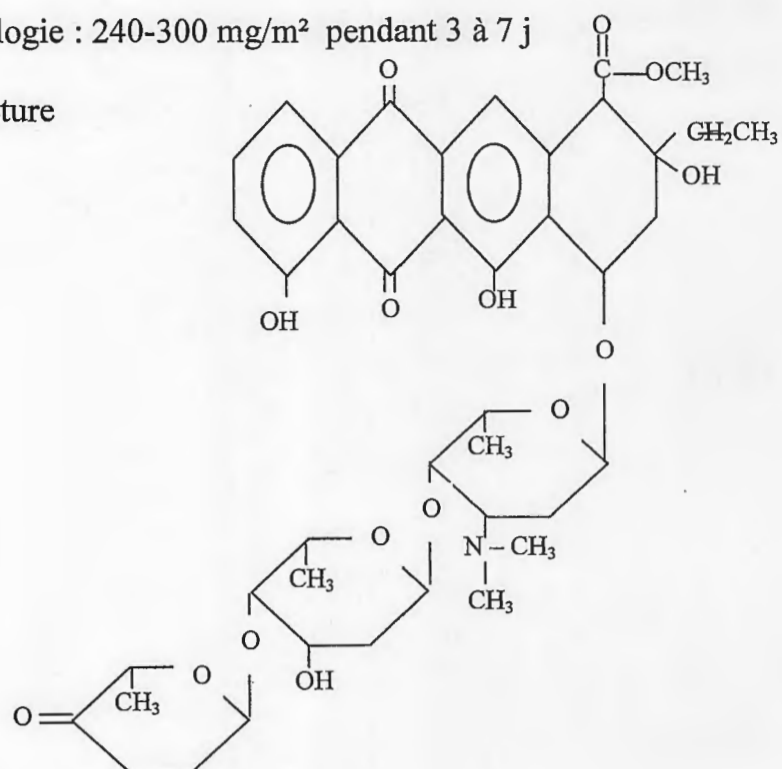


- Cardiotoxicité : survient après une dose cumulative supérieure à 1800 mg/m²

4.5. Aclarubicine [3]

- Posologie : 240-300 mg/m² pendant 3 à 7 j

- Structure

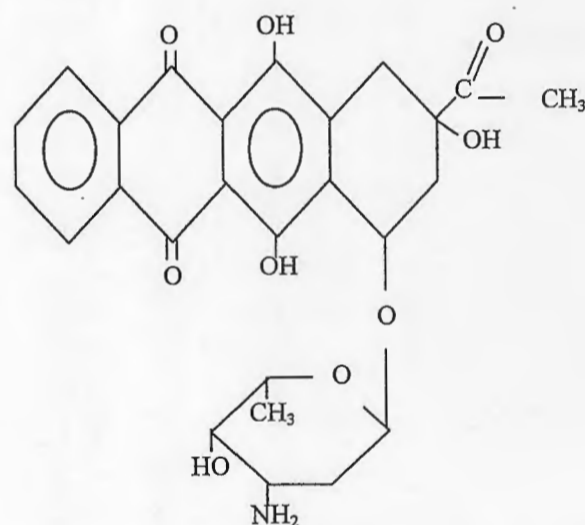


- Cardiotoxicité : l'apparition de leur cardiotoxicité est très minime

4.6. Idarubicine [9]

- Posologie : 12 mg/m²/j pendant 3 j

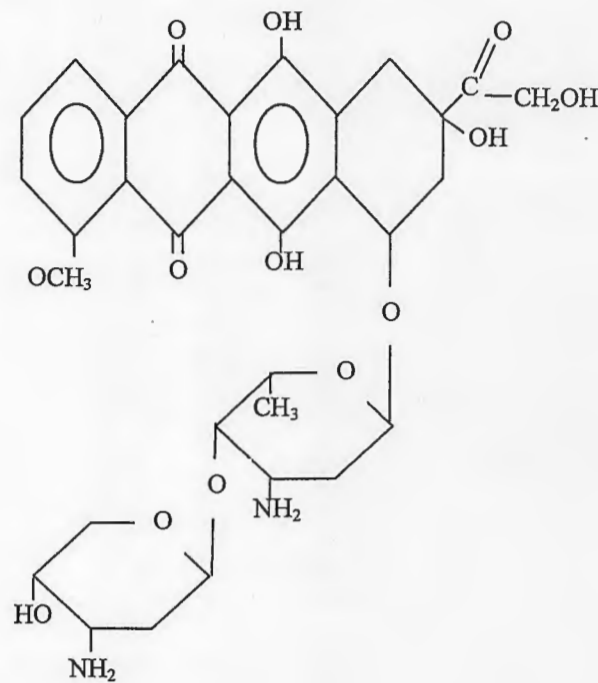
- Structure



- toxicité Cardiaque : survient après une dose cumulative supérieure à 93 mg/m²

4.7. Pirarubicine [9]

- Posologie : 50 mg/m² toutes les 3 à 4 semaines
- Structure



- Toxicité Cardiaque : survient après une dose cumulative supérieure à 600-700mg/m²

5. Utilisation des anthracyclines

Deux grands types d'indications sont à distinguer pour les anthracyclines :

- les leucémies et les lymphomes qui concernent essentiellement la daunorubicine et son analogue non méthoxylé en 1, l'Idarubicine. Ainsi la seconde a été expérimentée, associée au chlorambucil et à la dexaméthasone, en administration orale, dans le traitement des lymphomes non Hodgkinien de bas grade, avec un taux de réponse globale de 83%.
- Les tumeurs solides pour la doxorubicine, l'épirubicine et la pirarubicine. [9].

Les principales indications de la doxorubicine et épirubicine sont :

- Les cancers du sein, de l'endomètre, de l'ovaire, des testicules, de thyroïde et du poumon, ainsi que dans le traitement de nombreux sarcomes dont le neuroblastome, le sarcome d'Ewing, l'ostéosarcome et rhabdomyosarcome.[9] , pour la pirarubicine, l'indication unique est le cancer métastatique du sein avec récurrence locale [10].
- L'idorubicine s'est révélée efficace dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques, leucémies aiguës lymphoblastiques [10].

6. Pharmacologie

Parce qu'il est difficile d'étudier les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques des différentes classes d'anthracyclines, on va limiter notre étude sur la doxorubicine qui est le chef de file de ces médicaments.

6.1. Voie d'administration

La doxorubicine est administrée par voie intraveineuse stricte et se fixe rapidement sur les tissus sous forme active non métabolisée [11].

6.2. Demi-vie

Après administration intraveineuse, la concentration plasmatique de la doxorubicine décroît de façon triexponentielle ou triphasique,[11,12] : une phase très rapide de demi-vie inférieure à 2 heures [12] et égale à 5 minutes [11], une phase plus lente ou intermédiaire de demi-vie égale à 1 heure [11], 2 à 8 heures [12] et une phase très lente de demi-vie comprise entre 20 et 40 heures [11].

6.3. Métabolisme (biotransformation)

La doxorubicine est l'enjeu de réactions métaboliques se déroulant dans le foie et comportant une réduction et une hydrolyse des substituants du noyau.

La réduction carbonyle de la chaîne latérale aboutit à la formation d'un alcool, le doxorubicinol, métabolite actif plus facilement retenu dans le milieu intracellulaire. La moitié aglycone est inactive [1,5].

6.4. Elimination

La doxorubicine est éliminée essentiellement par l'excrétion biliaire sous forme de produit inchangé et de métabolites, 40 à 50 % de la dose sont récupérés en 7 jours.

L'excrétion urinaire est négligeable (environ 5 à 10 % de la dose principalement sous forme de produit inchangé).

Compte tenu de l'élimination hépatobiliaire de la dose, toute modification de la fonction hépatique peut entraîner une augmentation des taux plasmatiques des produits avec une demi-vie très allongée en cas d'insuffisance hépatique sévère et un risque de toxicité [11].

Chapitre II : La Cytotoxicité
des Anthracyclines

I. Cytotoxicité des anthracyclines

Les effets cytotoxiques des anthracyclines consistent à une interaction directe ou indirecte avec l'ADN qui sera responsable de la mort cellulaire.

L'interaction directe peut être caractérisée avec l'ADN purifié. D'autres stigmates de cette interaction directe ne sont caractérisés que sur l'ADN extrait de cellules prétraitées par la molécule étudiée et impliquent dans ce cas une activation métabolique préalable de la molécule et/ou l'intervention simultanée de mécanismes cellulaires, notamment de réparation des lésions de l'ADN

Les anthracyclines peuvent également agir indirectement sur l'ADN en inhibant des réactions enzymatiques nécessaires à sa réplication ou à sa transcription [3].

I.1. Principaux mécanismes de cytotoxicité des anthracyclines

Malgré une utilisation chimique, les mécanismes d'action des anthracyclines dans les cellules cancéreuses restent un sujet de controverse. Dans un commentaire, les mécanismes qui ont été examinés sont les suivants [13].

I.1.1. Effet intercalant

L'intercalation est le phénomène au cours duquel une molécule polycyclique plane "se glisse" et se fixe aux hélices d'ADN en s'intercalant entre deux plateaux de nucléotides, perpendiculairement à l'axe de l'hélice (figure 2). Elle entraîne un éloignement des paires de bases, une désérialisation de l'ADN et une accessibilité accrue du petit sillon de l'ADN. Il s'agit d'une liaison réversible mais qui peut être stabilisée par une liaison secondaire entre la molécule intercalante et un désoxyribose ou un groupement phosphate de l'ADN.

L'insertion des substances intercalantes est relativement spécifique, à la fois de la structure et de la séquence en bases de la région de l'ADN concernée.

L'intercalation est responsable d'une inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN ce qui explique l'utilisation des anthracyclines comme médicaments anticancéreux

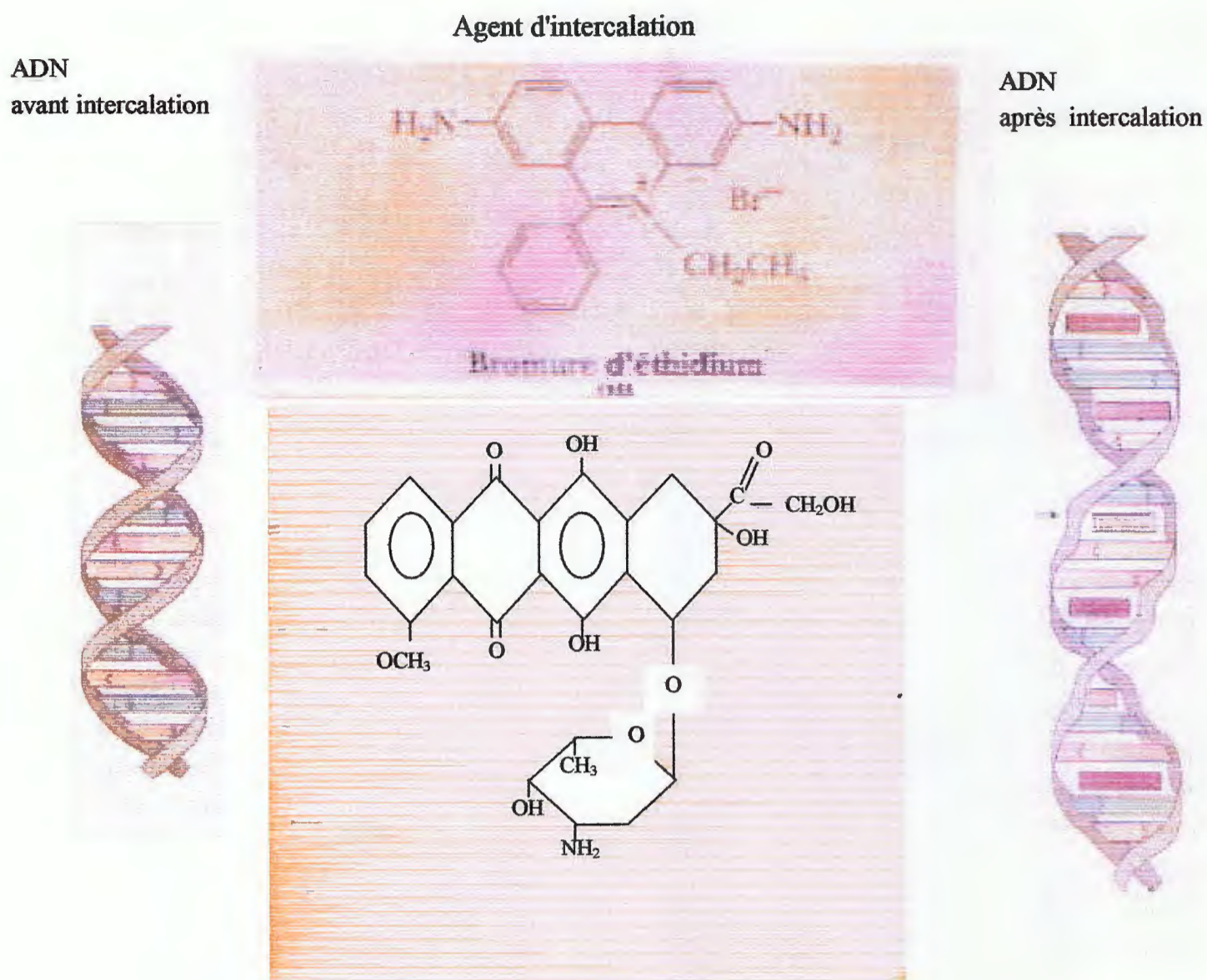


Fig. 2 : structure de deux agents d'Intercalation, le bromure d'ethidium et la doxorubicine et leur effets sur la structure de l'DAN [14].

Enfin, l'intercalation ne rend pas compte des cassures mono et bicaténaires liées à une protéine dont les intercalants anticancéreux sont responsables et qui serait couplées à l'activation de la topoisomérase [3,15].

I.1.2. Effet antitopoisomérase II

I.1.2.1. Topoisomérases

Les ADN topoisomérases sont des enzymes nucléaires qui contrôlent la structure de l'ADN. Ils interviennent en contrôlant la torsion et l'enroulement des deux brins de l'ADN pour permettre le déroulement des processus essentiels à la vie de la cellule ; la transcription, la réplication et la réparation des structures lésées.

Deux types de DNA topoisomérases sont décrits : la topoisomérase de type I est une protéine monomérique codée par un gène situé sur le chromosome 20. Elle se fixe sur l'ADN double brin pour y couper l'un des deux brins et y former un pont covalent entre un résidu tyrosine et un 3- phosphate de l'ADN coupé. Les tissus tumoraux (cancer du colon ou de l'ovaire) contiennent des quantités relativement élevées de topoisomérases I comparativement aux tissus sains [1].

L'activité topoisomérase II est rapportée à deux isoenzymes, la topo2a est une protéine de 170 Kd codée par un gène situé sur le chromosome 17, la forme topo 2b est une protéine de 180 Kd codée par un gène situé sur le chromosome 3. L'action de la topoisomérase-II est ATP dépendante. Elle se fixe sur l'ADN double brin à 4 paires de bases de la lésion, coupe simultanément les deux brins de l'ADN, élimine la partie coupée, réintroduit successivement le fragment de chacun des deux brins initialement lésés qui sont rattachés à l'ADN par l'intermédiaire d'une ligase [1].

I.1.2.2. Anthracyclines et topoisomérase

Les anthracyclines agissent en stabilisant une réaction intermédiaire dans laquelle les brins d'ADN sont coupés et liés par covalence à des résidus tyrosine de la topoisomérase- II formant un complexe ADN-topo2.

La formation et la stabilité du complexe ternaire anthracycline-DNA-topoisomérase II dépend de certaines caractéristiques structurales bien définies. Ainsi, grâce à leur structure plane, les cycles B et C des anthracyclines empiètent sur les paires de bases

adjacentes de l'ADN alors que le cycle A reste en dehors du site d'intercalation. La partie externe ou moitié non intercalante de la molécule d'anthracycline, (la daunosamine et le cycle A) semble jouer un rôle important dans la formation et la stabilisation du complexe ternaire. Par exemple, la daunosamine en se plaçant au niveau du petit sillon de la molécule d'ADN est crucial pour l'effet antitopoisomérase II des anthracyclines. Il importe de savoir que l'inhibition de la topoisomérase II augmente après l'enlèvement soit de la fonction amine liée au carbone 3 de la daunosamine ou du groupe méthoxy lié sur la carbone 4 du cycle D. Cependant, la nature substituant porté par le carbone 3 de la daunosamine influence, beaucoup le lieu d'action des anthracyclines au niveau de l'ADN [16,17].

1.1.3. Génération des radicaux libres

La génération de radicaux libres oxygénés ou ROS par les anthracyclines est considéré comme le mécanisme principal de la cardiotoxicité des anthracyclines, mais l'intervention de ROS dans l'effet anticancéreux ou cytotoxique est démontré.

En effet, lors de leur métabolisme, la réduction enzymatique de l'anneau anthracycline produit un radical libre semi-quinone qui à son tour conduit à la production d'un radical libre hydroxyle; de plus la conjugaison de la partie hydroquinone de la molécule d'anthracycline avec le fer ferrique intracellulaire peut conduire à la production non-enzymatique de radicaux libres [18].

Le produit semi-quinone formé régénère rapidement sa moitié quinone par la réduction de l'O₂ en ROS comme l'anion superoxyde (O₂⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (figure 3). Ce cycle futile est maintenu par un certains nombres d'oxydoréductases à NADP tels que le cytochrome P450 ou b5 réductase et la NADH déshydrogénase mitochondriale, la xanthine déshydrogénase, le monoxyde d'azote synthase endothélial [19,20].

Au cours de ce cycle, la semi-quinone peut également s'oxyder avec la liaison entre le cycle A et daunosamine entraînant une déglycosidation réductrice avec formation d'un 7-désoxyaglycone (figure 3). Suite à leur liposolubilité élevée, les aglycones s'intercalent dans les membranes cellulaires et forment des ROS.

Ainsi, les dommages oxydatifs sont considérés comme un mécanisme important de l'activité antitumorale des anthracyclines [19,21].

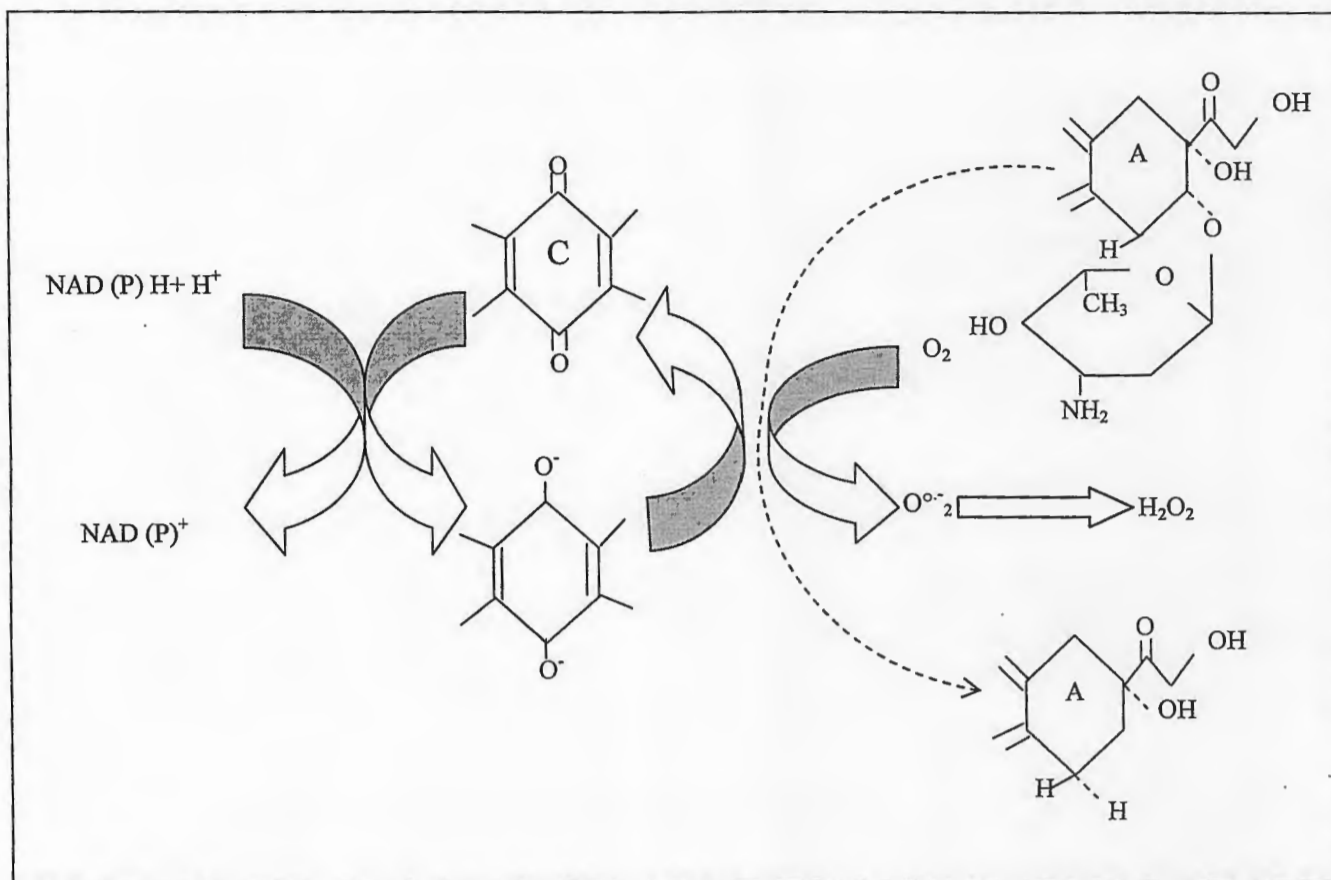


Figure 3 : la réduction d'un cycle d'anthracyclines par un électron [21].

1.1.4. Peroxydation lipidique

La réaction péroxydative en chaîne, entraîne la formation d'un "grand nombre" de ROOH qui se décompose à leur tour en fragments des radicaux libres et divers composés tels que aldéhydes et cétones qui sont capables d'attaquer les protéines dans la membrane cellulaire. Les acides gras insaturés phospholipidiques sont attaqués et transformés en hydroperoxyde (RH → ROOH), ce qui fragilise la membrane et éventuellement la détruit [22].

1.1.5. Interférences au niveau de l'hélicase

Des récentes études ont mis en évidence une inhibition de l'hélicase [23]. La présence d'anthracyclines préférentiellement au niveau de site GC pourrait être une explication de l'empêchement de la réparation des deux brins par cette enzyme. Bien que ces études aient été réalisées sur des modèles enzymatiques isolés, il est intéressant de

noter que les concentrations utilisées correspondent à celles rencontrées en clinique. Il y aurait donc une nouvelle possibilité d'action sur une cible enzymatique, mais ceci devra être vérifié sur des modèles cellulaires [9].

1.1.6. Induction de l'Apoptose

Il semble clair que l'une des conséquences du traitement par la doxorubicine et la daunorubicine est l'induction du phénomène d'apoptose [23]. Ce phénomène est souvent rencontré à des concentrations de l'ordre de 0,05 à 1 μm mais ne l'est plus lors de l'utilisation de concentrations supra cliniques ($> 5 \mu\text{m}$). Dans ce cas, la mort cellulaire s'explique par des mécanismes non physiologiques [9].

1.2.7. Arrêt du cycle cellulaire

Plusieurs études précises ont montré l'existence d'un effet des anthracyclines sur le cycle cellulaire ; elles le bloquent en phase G_2 . Récemment, des travaux ont confirmé le blocage en phase G_2 -M et mis en évidence l'induction par la doxorubicine d'une altération de l'activité du complexe P_{34} (CDC_2 /cycline B_1) jouant un rôle clé dans la régulation de la phase G_2 -M [24, 25, 26]

1.2.8. Autres mécanismes

D'autres mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer l'activité cytotoxique des anthracyclines, ainsi, il a été mis en évidence que certains anthracyclines:

- Sont responsables de l'induction du phénomène de différenciation des cellules leucémiques et des cellules de tumeur du sein [24, 27].
- Peuvent interférer avec les phénomènes de polymérisation de la tubuline et avec le cytosquelette [28, 29].
- Peuvent supprimer l'expression de gènes régulateurs de croissance spécifique [30, 31].
- Inhibent l'induction de NO synthase [32] dont l'implication dans les processus cancéreux et infectieux a été suggérée.

II. Apoptose et Nécrose

II.1. Apoptose

L'Apoptose est un type de mort cellulaire, programmée, caractérisée par un schéma particulier de changements morphologiques. Ce mot vient du mot de l'ancien grec fait référence à la chute des pétales des fleurs ou des feuilles des arbres en automne. L'apoptose est une forme physiologique de mort cellulaire hautement régulée et elle est nécessaire à la survie des organismes typiquement multicellulaires, elle peut donc être détectée par des modifications de la morphologie cellulaire ou de l'activité biochimique de la cellule (figure 4) [23].

Il s'agit d'un processus cellulaire actif atteignant son paroxysme lors de la mort cellulaire. Elle peut se produire en réponse à des signaux issus du développement ou de l'environnement, ou en réponse à des lésions physiologiques décelées par les réseaux de surveillance interne de la cellule (figure 4) [23].

II.1.1. Mécanisme moléculaire de l'apoptose

A ce jour, il existe deux grands sentiers par lesquels l'apoptose peut être induite dans une cellule (Figure 5). Le premier, est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort. Une autre voie appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose.

Ces deux voies de signalisation aboutissent toutes les deux à l'activation des caspases, familles des protéases ayant un rôle clé dans l'apoptose [33], et inactives à l'état latent et qui s'activent en cascade. Elles tirent leur nom de la présence d'une cystéine (c) dans leur site catalytique, et du fait qu'elles clivent leur substrat au niveau d'un aspartate (D) au sein d'une séquence consensus qui peut être soit DEVD, soit YVAD, ces peptides peuvent être employés en excès pour bloquer les caspases correspondant à l'un ou l'autre de ces substrat.

La principale caspase effectrice, dont l'activation déclenche l'apoptose, est la caspase-3. A l'état latent, la caspase-3 existe dans le cytoplasme sous forme de procaspase inactive.



Figure 4 : l'apoptose –suicide cellulaire actif- [23].

L'initiation de l'apoptose repose donc sur le clivage de la procaspase-3 sur un aspartate par d'autres caspases dites initiatrices (caspase-8 et caspase-9) en deux sites distincts (figure 5). Le premier clivage libère un prodomaine, le second clivage coupe la partie restante en un petit et un gros fragment qui s'associent alors entre eux. Dans cette conformation, la caspase-3 est active et clive à son tour ses substrats. Le plus important d'entre eux est l'enzyme qui assure la fragmentation de l'ADN, dénommé CAD. Plus précisément, CAD existe à l'état latent associée à un inhibiteur protéique, ICAD. C'est ICAD qui est la cible de l'activité protéolytique de la caspase-3, ce qui libère CAD qui peut alors exercer son action et fragmenter l'ADN en oligonucléotides [34].

II.1.1.1. La voie extrinsèque

Est souvent appelé la voie des récepteurs de mort cellulaire du fait que c'est la liaison entre un récepteur à la surface de la cellule et son ligand qui enclenche le processus [35].

La communication chimique est également employée pour déclencher la mort cellulaire. Certains signaux membranaires (tel que Fas-Ligand) ou sécrétés (tel que le TNF α) sont en effet capables de provoquer la mort cellulaire par apoptose des cellules sur lesquelles ils agissent. Pour cela ces signaux doivent interagir avec un récepteur membranaire appartenant à la famille des récepteurs de mort ou DR (Death receptor) [34].

II.1.1.1.1. Mécanisme moléculaire

Lorsque l'apoptose répond à un *signal d'origine extracellulaire* agissant sur un récepteur de la mort (DR), la caspase initiatrice est la caspase-8. Le mécanisme d'activation de la caspase-8 par le récepteur DR, tient pour sa part à la présence, dans la partie intracytoplasmique du récepteur, d'une séquence particulière dénommée domaine de mort (DD) (figure 6). Ces récepteurs sont donc constitués de sous-unités à un segment transmembranaire et porteuses d'un domaine de mort intracytoplasmique. La propriété de ces domaines de mort est de s'associer avec d'autres protéines à domaine de mort. Parmi celle-ci on trouve la protéine FADD (Fas-associated death domain) capable de s'associer avec le récepteur Fas oligomérisé par la liaison du ligand (figure 5 et 6). En plus du domaine de mort (DD), FADD, comporte un domaine de mort (DED pour death effector

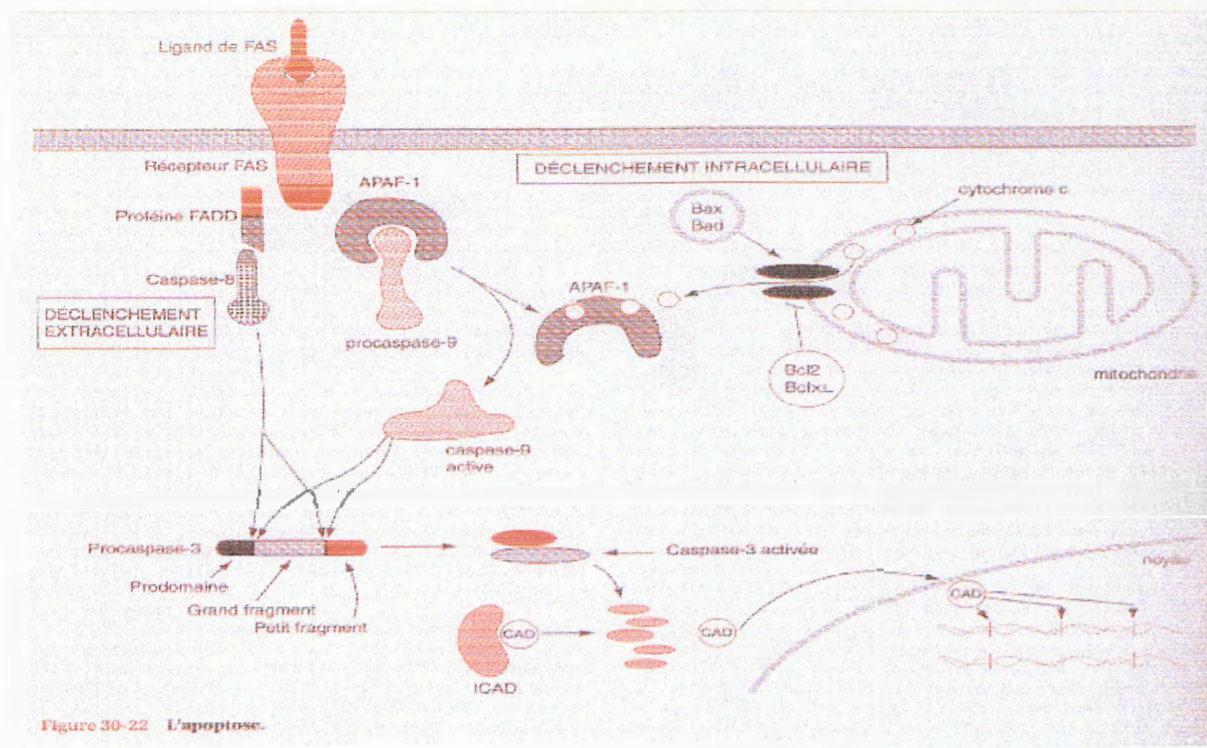


Figure 5 : les deux voies d'apoptose [34].

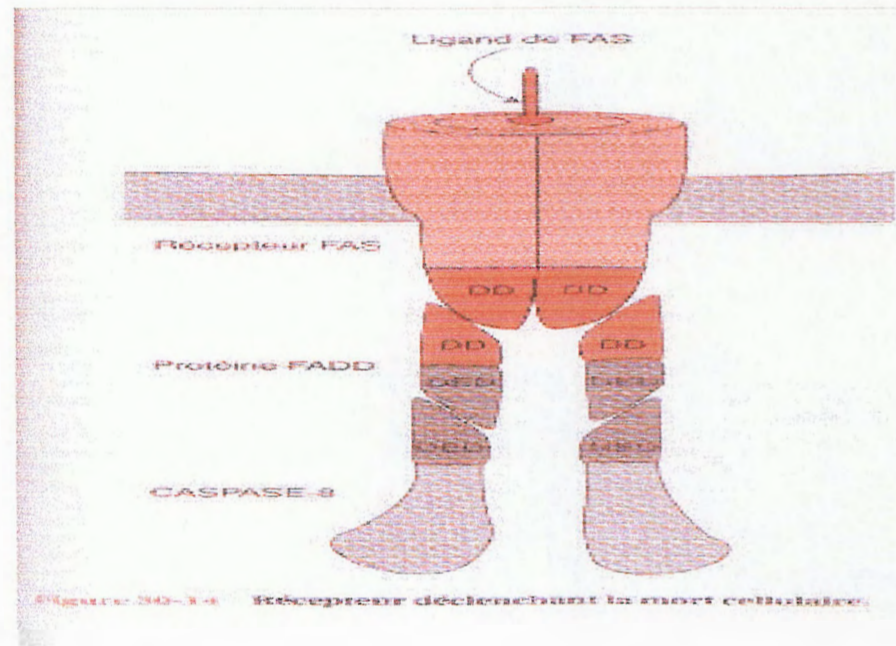


Figure 6 : récepteur déclenchant la mort cellulaire [34].

domain). Lorsque FADD est associé au récepteur, son DED peu à son tour s'associer par interaction protéine-protéine au DED de la caspase-8, qui est ainsi recrutée et activée. Elle peut dès lors activée, la caspase-3 et déclencher le processus de mort cellulaire par apoptose [34].

II.1.1.2. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque à pour éléments déclencheurs des insultes intracellulaires, comme l'augmentation du niveau de ROS, des dommages d'ADN, stress du réticulum endoplasmique, l'activation d'oncogènes [35].

Lorsque l'apoptose répond à un *signal d'origine intracellulaire*, la caspase initiatrice est différente puisque c'est essentiellement la caspase-9 qui joue ce rôle.

L'action de la caspase-9, et donc le déclenchement de l'apoptose à partir des signaux intracellulaires dépend d'une série d'événements siégeant au niveau de la mitochondrie. C'est en effet la translocation dans le cytoplasme du cytochrome C, normalement intramitochondrial, qui active la caspase-9 (figure 4). A l'état latent, elle est en effet sous forme de procaspase-9 et associée à APAF1 (apoptosis-activating factor1) dans le cytoplasme. S'il est relargué dans le cytoplasme, le cytochrome C s'associe avec APAF1, ce qui libère la procaspase-9 et l'active, déclenchant l'apoptose.

Le mécanisme commandant, pour le cytochrome C, sa rétention dans le mitochondrie ou au contraire sa translocation dans le cytoplasme repose sur un équilibre entre des protéines pro- et anti-apoptotiques situées sur la membrane mitochondriale et ouvrant ou fermant les pores qui permettent ce transport. Ces protéines appartiennent à une famille dont le chef de file est le Bcl₂, protéine antiapoptotique. Lorsque les facteurs antiapoptotiques sont en excès, le cytochrome C demeure intramitochondrial et déclenche la mort cellulaire par un mécanisme actuellement inconnu mais indépendant des caspases [34].

Ce mécanisme de mort cellulaire fait bien entendu l'objet de contrôles très stricts. Au-delà du contrôle de la mort par les récepteurs de mort de la famille DR, la survie cellulaire est elle aussi contrôlée par des signaux extracellulaires.



Les facteurs de croissance, en agissant sur des récepteurs tyrosine Kinases couplés avec la PI₃-Kinase, favorisent ainsi la survie cellulaire car le PKB inhibe par phosphorylation Bad (protéine pro-apoptotique) et la caspase-9. Enfin la protéine P53, qui est activé lorsque l'ADN est endommagé, déclenche l'apoptose en induisant la transcription du gène codant pour Bax. Un certain nombre d'anomalies du contrôle de l'apoptose se rencontrent dans les cancers : perte de fonction de la P53, gain des fonctions de Bcl2 etc. En revanche l'excès d'apoptose conduit à des affections dégénératives, apparents surtout dans le cerveau car les neurones morts ne sont pas remplacés. Le développement de médicaments bloquant l'apoptose, en particulier d'inhibiteurs des caspases, vise à prendre en charge ce type d'affection [34].

II.2. La nécrose ou mort cellulaire accidentelle

La nécrose est une mort cellulaire résultant d'une lésion irréversible de la cellule. Les membranes cellulaires gonflent et deviennent perméables. Des enzymes lytiques détruisent les contenus cellulaires, qui se déversent ensuite dans le milieu extracellulaire et conduisent à l'élaboration d'une réponse inflammatoire (Figure 7) [23].

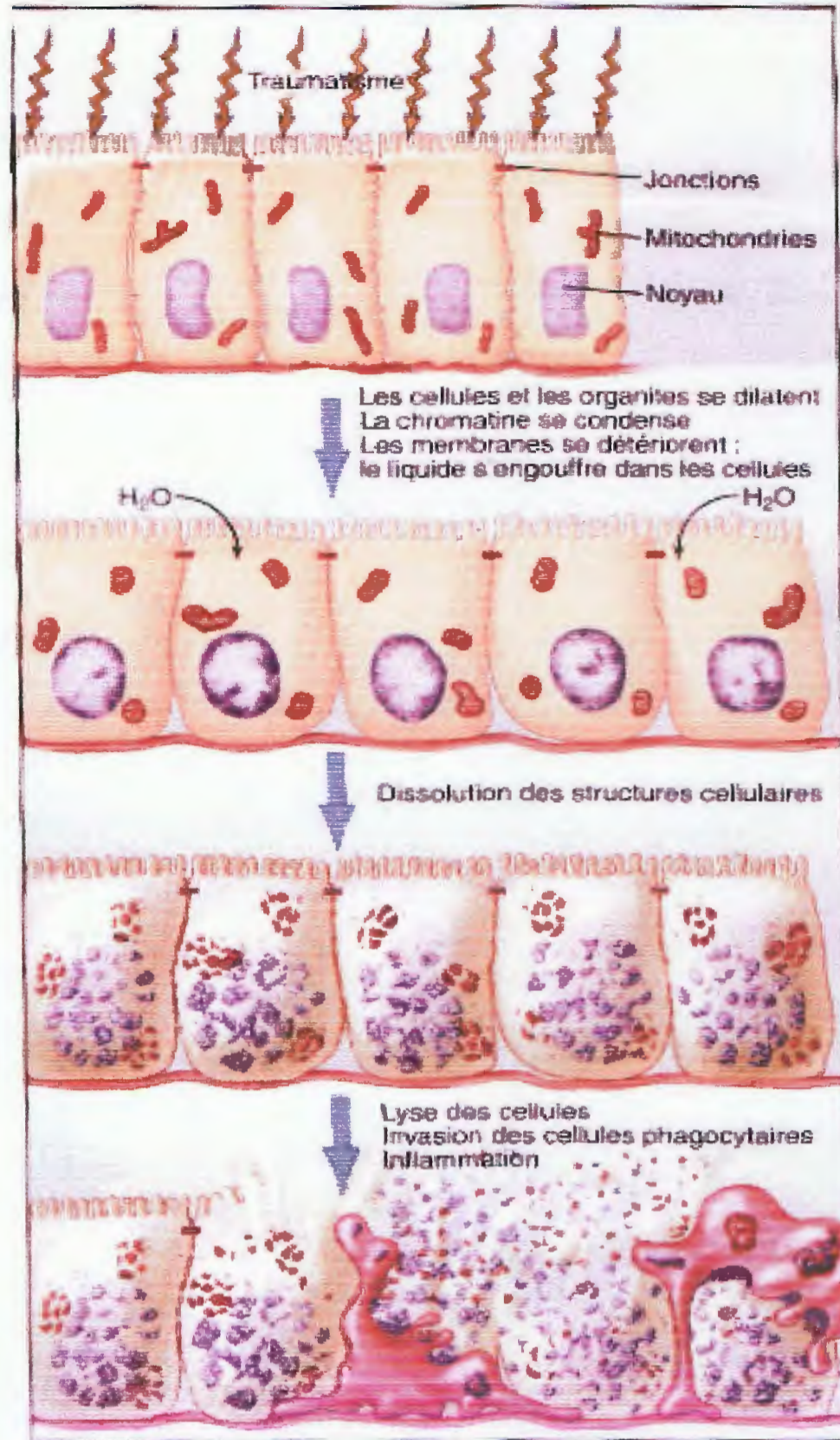


Figure 7: nécrose –mort cellulaire accidentelle- [23].

Bien que l'apoptose et la nécrose conclure par la mort cellulaire ils s'opposent point par point, tant sur le plan biochimique que sur le plan morphologique tableau 1.

Tableau 1 : comparaison biochimique et morphologique de l'apoptose et nécrose :

	Apoptose	Nécrose
Causes	Mort cellulaire physiologique "naturelle" par suicide provoqué par la mise en marche d'un programme génétique en réponse à des signaux extra et intracellulaires	Mort cellulaire pathologique "accidentelle" par meurtre provoqué par une agression physique ou chimique de l'environnement cellulaire
Morphologie	1-Bourgement de la membrane plasmique et fragmentation de la cellule et de son noyau (fragmentation de l'ADN) en corps apoptotiques, vésicules contenant des organites structurellement intacts, sans rupture membranaire. 2-phagocytose des corps apoptotiques par des macrophages	1- gonflement et éclatement de la cellule et de ses organites par rupture membranaire. 2-déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant provoquant une réaction inflammatoire
Biochimie	1-processus actif, requit de l'énergie, nécessitant la synthèse de protéines spécifique. 2-au cours de la condensation cellulaire : perte des contacts cellulaires avec les cellules voisines ; translocation des phosphatidylsérine de la face externe de la membrane plasmique, permettant la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes. 3-libération par les mitochondries de divers facteurs (cytochrome C,...) 4-activation de la cascade des caspases. 5-au cours de la condensation nucléaire : fragmentation spécifique de l'ADN [23].	1-processus passif, ne requérant pas d'énergie. 2-perte de la régulation de l'homéostasie cellulaire de l'eau et des ions. 3-fragmentation aléatoire de l'ADN [23].

Chapitre III : La Cardiotoxicité
des Anthracyclines

La Cardiotoxicité des anthracyclines et radicaux libres

1. Les radicaux libres

On appelle radicaux libres des fragments de molécules ou atomes n'ayant pas saturés, leur octets périphériques ou ayant des électrons en surnombre, ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique alors que ceux-ci doivent normalement être de spins opposés quand ils sont dans la même case (le spin est la rotation sur lui-même de chaque électron).

Dans les formules chimiques, on représente les radicaux libres avec un point placé en haut et à droite en exposant, pour symboliser les électrons célibataires. La durée de vie des radicaux libres est très brève de l'ordre de la milliseconde ou moins encore. Les ions formés par transfert d'électron sans transfert d'énergie, ne sont pas des radicaux libres [15].

1.1. Réactivité des radicaux libres

Les radicaux libres sont très réactifs. On dit qu'ils sont agressifs, et la raison en est que d'une part, la rupture d'une liaison, (pour réagir), est évitée, puisque l'électron célibataire n'est pas engagé, et que d'autre part l'orbital périphérique de l'atome est à moitié vide, ce qui facilite le contact avec une autre molécule. Les réactions radicalaires sont très rapides, sauf cas particulier [22].

1.2. Formation des radicaux libres

A l'intérieur du corps, il n'y a pas de radiations, ni de température élevées et l'on pense que les radicaux libres apparaissent sous l'action de l'oxygène [22].

1.2.1. Dérivés d'oxygène ou ROS

Le terme *formes réactives de l'oxygène* FRO ou ROS en anglais (figure 8) englobe un ensemble des dérivés réduits de l'oxygène, comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou le radical hydroxyl (OH^{\cdot}). Ces dérivés sont normalement générés par le métabolisme cellulaire, en particulier dans les mitochondries,

lors de la réduction de l'oxygène moléculaire en H_2O . Ils sont en outre produits en quantités importantes dans certaines conditions, par exemple lors de l'exposition aux rayonnements ionisants ou aux rayons ultraviolets, ou de l'exposition à certains produits chimiques.

Par ailleurs, certaines dérivées de l'oxygène comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou le nitroperoxyde $^{\circ}ONOON$, ne sont pas des radicaux libres mais, sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs. L'ensemble de ces radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène [22].

L'oxygène est toxique pour certains organismes, mais il est cependant beaucoup moins réactifs que certain de ses sous-produits nés de l'activité des oxydases [36].

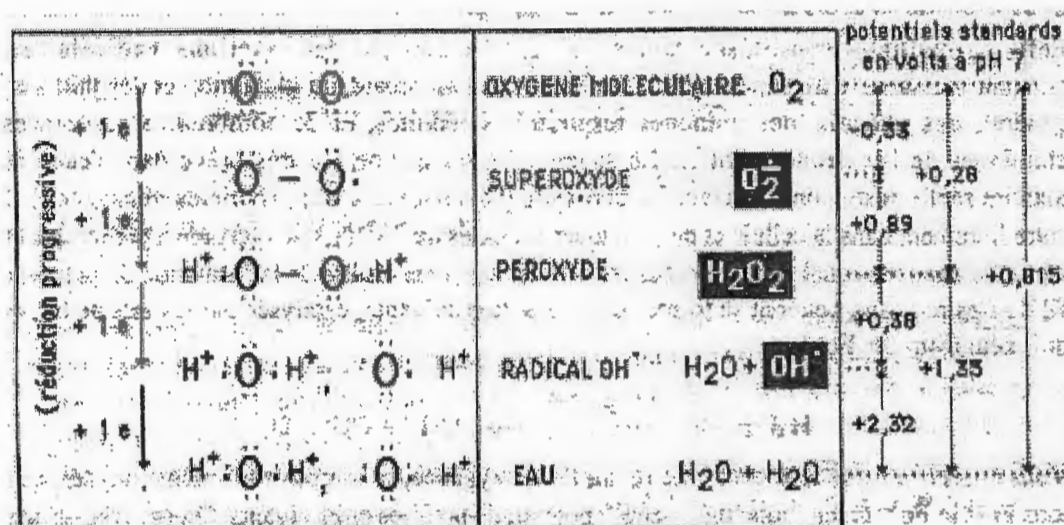


Figure 8: les différents degrés d'oxydation de l'élément oxygène [36].

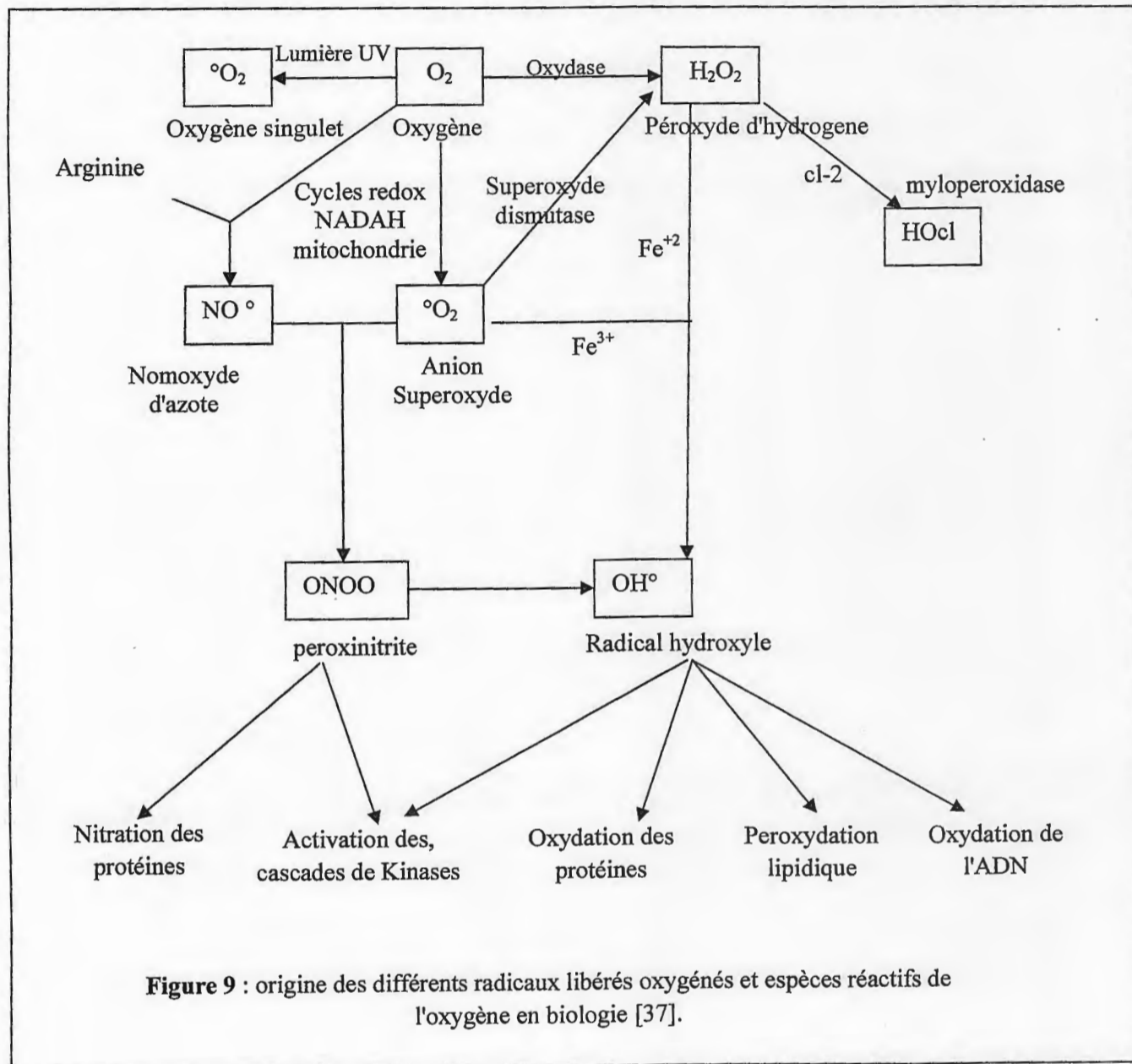
1.2.2. Voies de génération de ROS (figure 9)

a. Voies enzymatiques

A coté des flavoprotéines dits "oxydases" responsables de la production enzymatique de ROS, autres types d'enzymes les mono-oxygénases, enzymes catalysant la fixation d'un atome d' O_2 en un substrat, sont également responsables de génération de ROS durant le cycle réactionnel impliquant le cytochrome P450.

Le cytochrome P450 fait apparaître l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sous forme liée au fer à deux endroits du mécanisme. On estime que les P450 peuvent aussi libérer dans des conditions particulières, l'oxygène singulet mentionné plus haut [36].

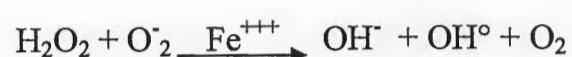
Certaines mono-oxygénases comme le salicylate hydroxylase peuvent laisser avorter leur cycle réactionnel et libérer O₂^{•-} et H₂O₂. C'est ce qui se produit en présence d'analogues de substrat dont l'hydroxylation est impossible. Les électrons continuent à affluer sur la mono-oxygénase et on observe alors un découplage entre l'oxydation du NAD (P) H et la mono-oxygénase [36].



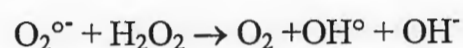
b. Voies non enzymatiques**➤ Réaction de Fenton**

La réaction de Fenton correspond à l'oxydation de fer ferreux en fer ferrique par l'eau oxygénée, formant OH° et OH^- . Les ions Fe^{3+} sont à leur tour réduits par l'eau oxygénée, donnant du superoxyde, il s'en suit une cascade de réactions [36].

Plusieurs constituants peuvent s'oxyder à l'air par des réactions radicalaires, donnant naissance à du superoxyde, c'est le cas de l'ascorbate, du glutathion, et des thiols en général, des phénols, des quinones respiratoires réduits et de nombreuses substances chimiques de l'environnement. Ces radicaux peuvent se former par la réaction suivante, catalysées par des sels de fer et dite réaction Fenton:

**➤ Réaction de Haber -Weiss**

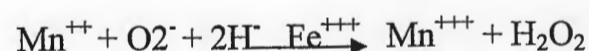
On connaît une réaction de $\text{O}_2^{\circ-}$ avec l'eau oxygénée qui donne naissance à un autre radical libre oxygéné, le radical hydroxyle OH° , cette réaction appelée réaction de Haber et Weiss, est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants [9]



La présence des concentrations de catalase relativement faibles dans les tissus cardiaques et dans la présence des sels de fer, les réactions de Fenton ou de Haber-Weiss peuvent avoir lieu [21].

➤ Autres réactions

Voici une autre réaction, dont on parle moins, où le superoxyde agit comme oxydant, elle concerne les ions manganèses



Les ions manganèses ainsi oxydés peuvent être stabilisés par diverses molécules organiques et deviennent alors des agents oxydants très puissants [36].

1.3. Les effets des radicaux libres

Comme toutes les molécules présentes dans les êtres vivants, les radicaux libres oxygénés exercent des effets utiles et des effets nuisibles [15].

1.3.1. Les effets des radicaux libres sur les oses

Les sucres simples ou complexes résistent bien aux radicaux libres oxygénés. Le glucose constitue un " scavenger" d' O_2^- , c'est-à-dire un composé qui capte le radical libre et l'empêche d'exercer ses effets toxiques sur d'autres molécules. Le mannose est surtout son dérivée réduits, le mannitol, sont des scavenger du radical hydroxyle, le seul ose complexe attaqué par l'ion superoxyde est l'acide hyaluronique, qui est fragmenté par son action [15].

1.3.2. Les effets des radicaux libres sur les lipides

L'effet des radicaux libres sur les lipides est porté essentiellement sur les acides gras polydésaturés. L'exposition de ceux-ci aux radicaux OH^- provoque des réactions radicalaires en chaîne à partir de carbone central des radicaux divinyl méthane $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$ fréquents dans ces molécules.

Le radical OH^- attire un atome d'hydrogène qui laisse un électron non apparié sur le carbone central. L'acide gras est ainsi lui-même devenu un radical libre dans lequel se produisent des réactions successives de réarrangement des doubles liaisons. En présence d'oxygène, il se produit une fixation de celui-ci conduisant à la formation d'un peroxyde ou d'un hydro-peroxyde (figure. 10)

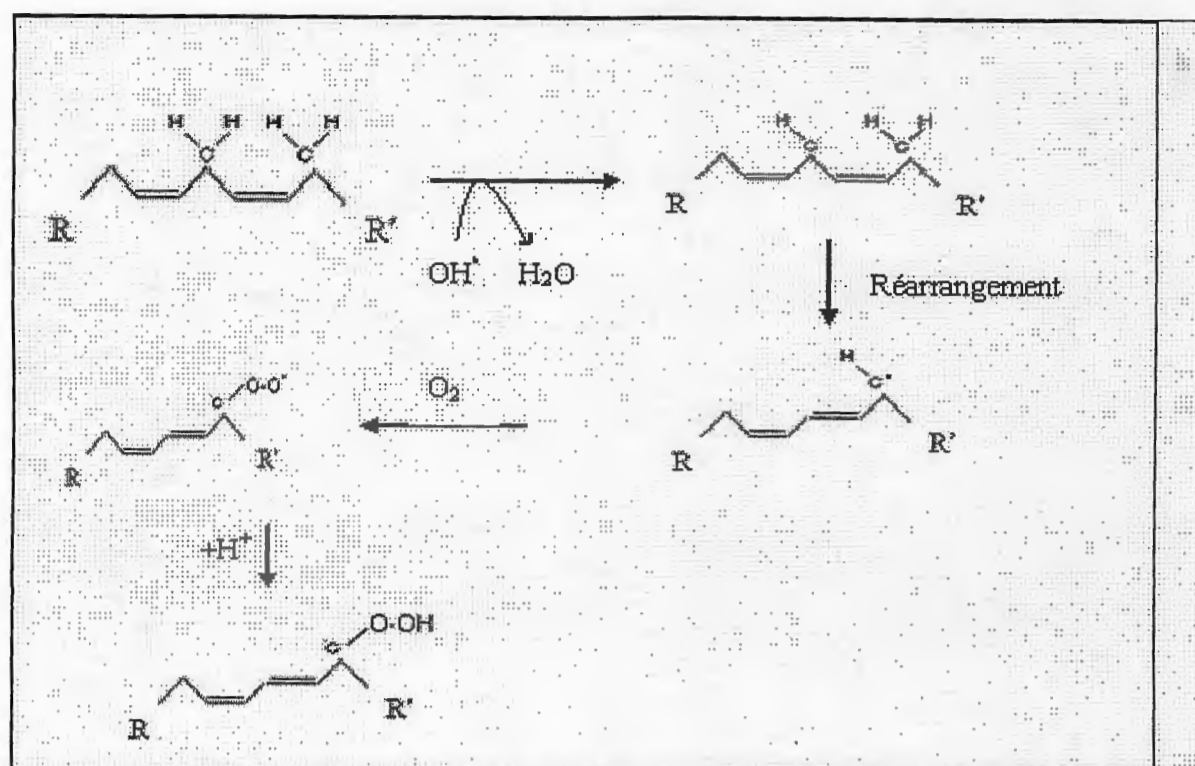


Figure 10 : mécanismes radicalaires provoqués par le radical libre hydroxyle sur un acide gras [15].

La peroxydation des acides gras désaturés peut aussi se produire dans les phospholipides, qui constituent des membranes cellulaires, cytoplasmiques ainsi que mitochondriales.

1.3.3. Les effets des radicaux libres sur les protéines

Les effets des radicaux libres oxygénés sur les protéines sont complexes. Ils portent sur les chaînes latérales de certains résidus d'acides aminés : le thiol des cystéines et le méthyle des méthionines sont oxydés en sulfates, le cycle des histidines est ouvert, ainsi que celui des tryptophanes. Il en résulte l'inactivation du thiol - Enzymes. Les thiols peuvent aussi être oxydés en ponts disulfure anormaux, d'où des changements de conformation des protéines nuisibles à leur activité biologique. Certaines protéines mitochondriales seraient dégradés par les radicaux O_2^- formés par la chaîne respiratoire lorsque le fonctionnement de cette dernière est bloqué [15].

1.3.4. L'effet des radicaux libres sur les acides nucléiques

Les acides nucléiques, sont sensibles à l'action des radicaux libres oxygénés. On a observé expérimentalement des cassures et des anomalies chromosomiques sous l'effet de O_2^- . Des bases purines peuvent être arrachées par les radicaux libres, forment des sites apuriniques [15].

2. Cardiotoxicité des anthracyclines

Les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, épirubicine) sont des agents antitumoraux très largement utilisés en cancérologie, toutefois, un certain nombre d'effets secondaires, notamment sur l'hématopoïèse et la fonction cardiaque, limitent leur utilisation.

La cardiotoxicité de ces médicaments consiste en une insuffisance cardiaque d'apparition retardée dont la fréquence est proportionnelle à la dose cumulée, l'atteinte cardiaque peut être brutale, irréversible, fréquemment létale [38].

Morphologiquement, la cardiomyopathie est caractérisée (biopsie de l'endomyocarde) par : la perte de myofibrilles dilatation du réticulum sarcoplasmique, vacuolisation du cytoplasme, enflement des mitochondries et l'augmentation du nombre de lysosomes [39].

Le métabolisme de la doxorubicine entraîne l'apparition des radicaux libres, principalement l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle OH^\cdot . Ces molécules chargées négativement sont très instables et responsables de l'oxydation des lipides polyinsaturés, avec désorganisation membranaire et dysfonctionnement de la respiration mitochondriale. Ces radicaux libres sont créés par deux voies différentes : la voie de la réduction par les flavines réductases placées au niveau de la membrane mitochondriale avec transformation de l'anthracycline en dérivé semi-quinone puis hydroquinone en cédant des électrons (voir chapitre II); la voie non enzymatique par la réaction d'Haber-Weiss avec liaison du cation Fe^{3+} avec trois molécules de doxorubicine puis réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} avec transfert d'électrons.

Les anthracyclines sont aussi responsables d'un largage intracellulaire de Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique. Cette augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracytoplasmique permet l'activation d'enzymes lytiques protéases et lipases Ca^{2+} -dépendantes.

Il est aussi constaté une inhibition par les anthracyclines de l'expression des gènes actine, troponine et myosine codant des protéines qui participent à la contraction du myocarde.

D'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer la cardiotoxicité des anthracyclines et s'ajoutent probablement aux précédents, notamment avec rupture de l'homéostasie du fer cardiaque, inhibition de la topo-isomérase II, largage de cytokines cardiotoxiques tels le TNF (tumor necrosis factor) ou l'interleukine 2, dysfonctionnement des neurones adrénergiques [20].

2.1. Rôle du Fer dans la cardiotoxicité

En plus des radicaux enzymatiquement générés, ils sont aussi générés via la réduction non enzymatique de la doxorubicine, qui a lieu après la formation d'un complexe de Doxorubicine avec des ions métalliques tels que Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , et Zn^{2+} . [21].

Le rôle du fer dans les dommages cardiaques induits par la doxorubicine apparaît bien compliqué. En plus il a été prouvé que les anthracyclines induisent le déséquilibre de l'homéostasie ferrique [19,40]. En effet, dexrazoxane, un chélateur du fer, est capable de limiter la toxicité cardiaque des anthracyclines parce qu'il empêche les lésions histologiques et le disfonctionnement contractile induits par ces derniers.

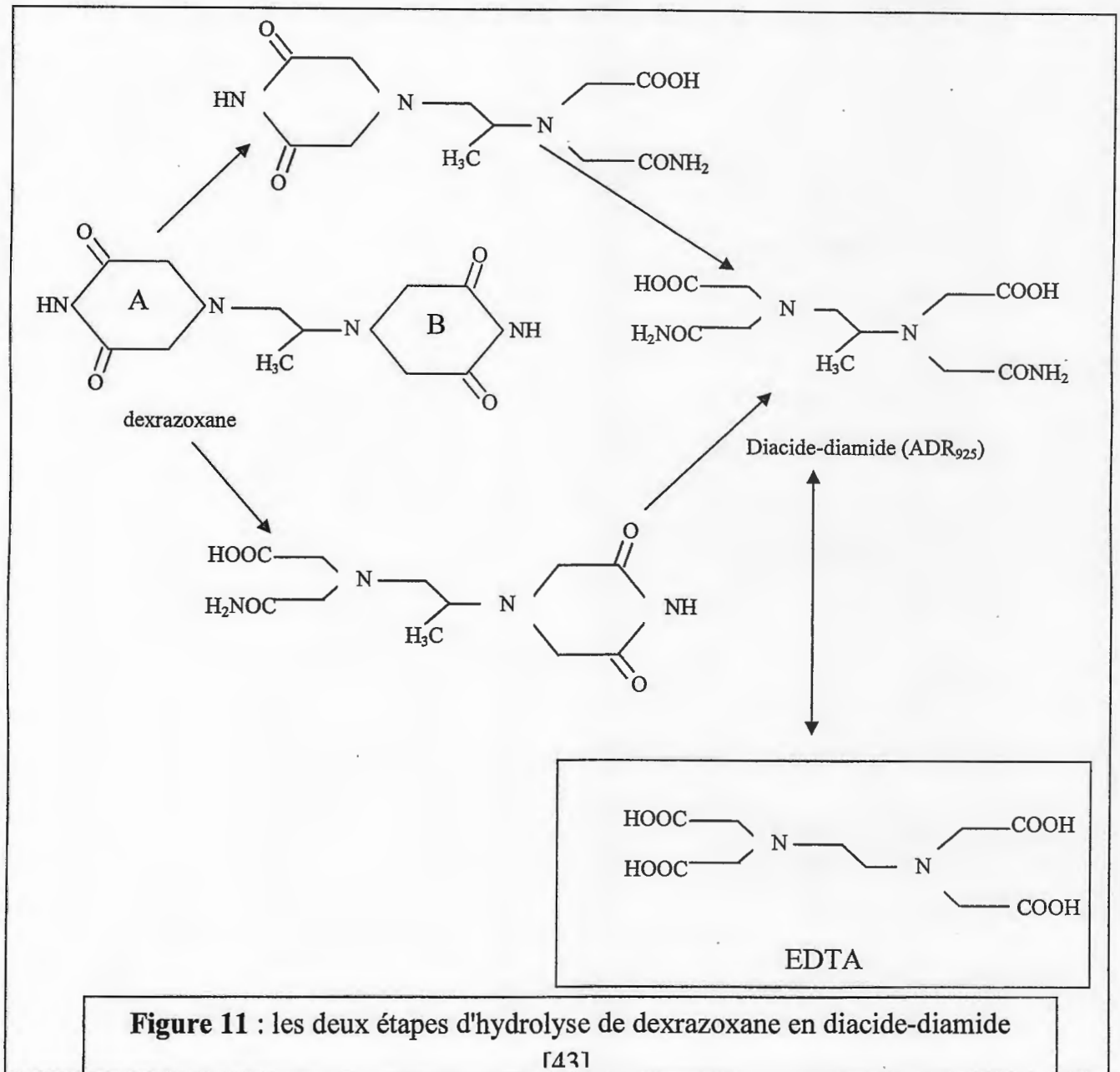
Le dexrazoxane ne perturbe pas la distribution, le métabolisme ou l'excrétion de la doxorubicine, mais il réduit l'incidence de la cardiotoxicité [41].

a. Mécanisme

Les mécanismes d'interférences fondamentaux du dexrazoxane avec l'activité clinique de la doxorubicine ne sont pas élucidés [42].

Le dexrazoxane est un biskétopiperazine qui subit l'hydrolyse progressive de ces deux anneaux (A et B) de pipérazine pour former deux intermédiaires ayant un seul anneau ouvert. L'ouverture du 2^{ème} anneau par la suite, par l'hydrolyse, donne un diacide-diamide (figure 9), qui est un analogue structurel de l'EDTA; agent chélateur.

Le composé formé dont le nom de code est ADR₉₂₅ complexe le fer déjà lié à des molécules intracellulaires de faible poids moléculaire [43]. Cette complexation entraîne l'inhibition de la réaction de Fenton d'où l'arrêt de formation de ROS (voir paragraphe : 1-3-2-a)



2.2. Sensibilité du cœur aux anthracyclines

Par rapport à d'autres cellules ou organes, le cœur et les cellules cardiaques ou cardiomyocytes sont plus sensibles aux effets délétères des anthracyclines, étant donné les caractéristiques spécifiques du tissu cardiaque.

2.2.1. Richesse du cœur en mitochondries

Les mitochondries représentent 50% du poids du cœur d'où un taux élevé de cardiolipides, phospholipides présents dans la membrane interne des mitochondries, et favorisant l'accumulation des anthracyclines (doxorubicine) dans les cellules cardiaques étant donné la grande affinité de la doxorubicine pour les cardiolipides. [21].

2.2.2. Faibles teneur en défenses antiradicalaires

La sensibilité particulière du cœur aux anthracyclines serait également liée à un déficit relatif des défenses antioxydants des myocytes cardiaques par comparaison à d'autres tissus, traduit par un taux relativement bas de superoxyde dismutase et de catalase et un faible taux de renouvellement du glutathion. En outre la Doxorubicine est responsable de la destruction de glutathion peroxidase qui est responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène [44].

3. Anthracyclines et mitochondrie

L'exposition aigue d'organes ou de tissus aux anthracyclines cause des dommages mitochondriaux, qui s'accumulent avec le temps et compromettent finalement la capacité bioénergétique de ces organelles. Ceci permet de postuler que les anthracyclines entrent dans les mitochondries et entraînent la formation des ROS responsables des éventuelles lésions de l'ADN mitochondrial [45].

En effet, les mitochondries sont la principale source d'oxydants et constituent donc leur cible privilégiée étant donné que la chaîne respiratoire produit une quantité importante de ROS puisque 2 à 4% de l'oxygène réagissant avec la chaîne respiratoire sont incomplètement réduits et donne naissance aux ROS. Les mitochondries contiennent

des systèmes antioxydants enzymatiques comme la SOD, qui ne constituent cependant pas une arme de défense parfaite [46,47].

3.1. Dommages d'ADN mitochondriaux induits par les ROS

Le stress oxydatif se traduit au niveau des mitochondries par une peroxydation lipidique, une oxydation protéique et des mutations dans l'ADNmt. Ces mutations de l'ADNmt sont transmises pendant la division mitochondriale et vont entraîner des altérations de la chaîne respiratoire qui à leur tour vont entraîner une augmentation de la production de ROS qui vont à leur tour endommager à nouveau l'ADNmt. Ainsi, le taux de mutations de l'ADNmt augmente graduellement et le fonctionnement mitochondrial s'altère progressivement avec l'âge [46,47].

D'autre part, la plus grande susceptibilité du génome mitochondrial aux dommages est due à plusieurs facteurs :

- Absence d'une organisation complexe de la chromatine mitochondriale, qui sert de barrière protectrice contre le ROS. [48]
- L'ADN mitochondriale est déficiente en histones, protéines responsables de la compactation de l'ADN, d'où la sensibilité élevée de l'ADN mitochondrial aux attaques par des agents oxydants [48].
- La présence des ions métalliques qui peuvent fonctionner comme catalyseurs dans la génération de ROS [46,47].

3.2. Modification morphologiques de la mitochondrie :

Plus de 90% d'ATP utilisé par les cardiomyocytes sont produits par la mitochondrie. Tout changement dans la structure ou la fonction de la mitochondrie aura des répercussions directes sur la fonction des cardiomyocytes. L'évolution de la cardiotoxicité au cours d'un traitement par la doxorubicine s'accompagne précocement de changements d'ordre morphologique au niveau de mitochondries tels que le gonflement ou swelling, anomalie typique des cellules apoptotiques. D'autre part, une diminution de la respiration mitochondriale a été observée lors d'un traitement par la doxorubicine [49, 50,51].

3.2.1. Gonflement mitochondrial

Dans certaines conditions, les mitochondries sont le siège d'une transition de perméabilité par ouverture de **mégacanaux** ou **MTP** (*mitochondrial permeability transition pores*). Par ces mégacanaux fuiraient vers le cytosol des composés appartenant aux 2 chambres mitochondriales. La structure de ces mégacanaux n'est pas entièrement élucidée [46,47].

La libération du cytochrome C est souvent précédée d'un gonflement de la mitochondrie, phénomène qu'on peut suivre au spectrophotomètre à 540 nm. Ce gonflement est secondaire à l'ouverture des méga canaux ou MPT entraînant une libération massive du calcium (Ca^{2+}), phénomène à l'origine du gonflement [35].

3.2.2. Contrôle respiratoire

a. Définition

On appelle contrôle respiratoire ou le taux de respiration mitochondrial, le contrôle qui exerce l'ADP sur la vitesse de transport des électrons dans la chaîne respiratoire ou sur la vitesse de consommation de l' O_2 . Autrement dit, l'oxydation ne peut se produire par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire sans phosphorylation concomitante de l'ADP [52].

b. Etats du contrôle respiratoire

Chance et Williams [53] ont défini cinq conditions qui permettent le contrôle du taux de la respiration dans les mitochondries.

- Etat 1 : Disponibilité de l'ADP et du substrat, cet état correspond à des mitochondries stockées dans un tampon et énergétiquement affamées.
- Etat 2 : Disponibilité de substrat seulement, dans cet état les mitochondries sont des batteries qui sont énergétiquement prospères.
- Etat 3 : Capacité de la chaîne respiratoire elle-même quand tous les substrats et tous les constituants sont présentés en quantité saturantes.

- Etat 4 : Disponibilité de l'ADP seulement, cet état correspond à des mitochondries dont les batteries sont chargées à bloc.
- Etat 5 : Disponibilité de l'oxygène seulement.

Les cellules en état de repos seraient dans l'état 4 alors que l'état 3 ou 5 correspondraient à des cellules en grande activité, exercice physique par exemple [36,52].

c. Anthracyclines et respiration mitochondriale

➤ Interaction doxorubicine et complexes de Green

La doxorubicine peut interférer avec la fonction mitochondriale à plusieurs niveaux, inhibant certains composants de la chaîne respiratoire. Les complexes respiratoire ou complexes de Green situés dans la membrane interne de la mitochondrie représentent un emplacement important d'accumulation de la doxorubicine, doivent être considérés comme cibles potentielles évidentes pour l'action toxiques de la doxorubicine (tableau 2).

➤ Interaction avec les états du contrôle respiratoire

- Etat 1: sans effets d'après notre étude bibliographique
- Etat 2 : sans effets d'après notre étude bibliographique
- Etat 3 : la doxorubicine inhibe l'état 3 de la respiration mitochondriale d'où une diminution dans la consommation de l'O₂. [46,47]
- Etat 4 : la doxorubicine stimule l'état 4 de la respiration mitochondriale. [46,47]
- Etat 5 sans effets d'après notre étude bibliographique

Ces effets semblent être dus à la grande affinité de la doxorubicine pour les cardiolipides et les phospholipides de la membrane mitochondriale interne.

Tableau 2 : les effets de la doxorubicine sur les complexes respiratoires

Complexes	Effets	Espèces	Refs
Complexes I : NADH Coenzymes Q réductases	Inactivation	Rat et bovin	[54]
Complexe II : la succinate-coenzyme Q réductase	Inactivation	Rat et bovin	[54]
Complexe III : la coenzyme Q cytochrome C reductase	Inactivation	Rat et bovin	[54]
Complexe IV : cytochrome C oxydase	Inactivation	Rat et bovin Rat	[54] [55]
Complexe V : ATP Synthase	Inactivation	Rat	[55]

Conclusion

Conclusion

Les anticancéreux sont des substances cytotoxiques capables de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant dans une certaine mesure les cellules normales à développement rapide. Parmi eux, les anthracyclines, agents chimiothérapeutiques largement utilisés pour le traitement de différentes tumeurs étant donné leur efficacité, déjà connue depuis leur découverte vers le début des années soixante.

Malheureusement, l'apparition d'atteinte d'ordre cardiaque suite à leur utilisation a conduit soit à limiter leur utilisation soit à diminuer la dose thérapeutique. Cependant, l'élucidation de leur mécanisme d'action anticancéreux ou cytotoxique ainsi que celui de la cardiotoxicité montre qu'il s'agit de deux mécanismes différents dans une grande mesure.

En effet, le mécanisme principal de cardiotoxicité reste la génération de ROS alors que le mécanisme de cytotoxicité serait lié surtout à leur interaction avec l'ADN.

Il importe de savoir que la sensibilité élevée du cœur à ces médicaments revient aux particularités tissulaires de cet organe étant donnée sa richesse en mitochondries et le faible taux de défenses antiradicalaires par rapport à d'autres organes.

Le présent travail, quoique limité, nous permet de faire les assertions suivantes :

- La mitochondrie reste la cible principale des anthracyclines.
- l'apoptose représente l'ultime étape de cette toxicité.
- La nécrose ne représente pas un éventuel mécanisme de cardiotoxicité et de cytotoxicité.
- L'activation de l'apoptose par les anthracyclines est déclenché essentiellement par la voie intrinsèque caractérisée par la translocation du cytochrome C.
- Les interactions de l'anthracycline avec l'ADN mitochondriale sont indirectes, c'est une conséquence des ROS générées par les anthracyclines.

Malgré leurs effets secondaires néfastes, les anthracyclines restent de loin les médicaments anticancéreux les plus employés notamment s'ils sont associés à des substances à effet scavenger.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- [1] **Pouillart P. (2001).** Pharmacologie des cytotoxiques antitumoraux. In : **Morère J.P ., Mornex F., Piccart M .,et Nabholz J.M.** Thérapeutique de cancer. *France. Spriger- Verlag* .PP :51-75.
- [2] **Cohen Y., Tacquot C. (2001).** Pharmacologie : chimiothérapie anticancéreuse. *.Masson. Paris*.PP :412.
- [3] **Schorderet M. (1989).** Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. *Slatkine. older Genève* .PP: 796-822.
- [4] **Pein F., Vassal G., Sakiroglu C., Tournade M.F., Hemerle J. (1995).** Aspects pédiatriques de la toxicité cardiaque des anthracyclines et implications pratiques pour sa prévention. *Archives pédiatriques*. 2(10) : 986-999.
- [5] **Appleton and Lange Stamford,C.T. (1998).** Pharmacologie fondamentale et clinique.PP :926.
- [6] **Bigras J.L ., Fourniera., Mocrindle B.W., Cartwright D., Davignon A., Leclerc J.M. (1995).** Functional cardiac disturbances related to chemotherapy independent of anthracycline use in children with neoclassic disease. *Am. J. cardial*. 75(1):101-103.
- [7] **Hortobagyi G.N., (1997).** Anthracycline in the treatment of cancer *Drugs*: 54 (suppl, 4): 1-7.
- [8] **Weiss R.B. (1992).** The anthracyclines; will we ever find a better doxorubicin. *Semin. Oncol*. 19: 670-686
- [9] **Bernades-Genisson.v.,Bernadou.J.,BrionJ.D.,Couquelet J., CussacM.etal.(2003).** Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers.PP:364-398.
- [10] **Dorosz Ph. (2006).** Guide pratique des médicaments, 26^{eme} édition. *Maloine*. Paris. PP : 1687.
- [11] **Anonyme. (2005).** Dictionnaire Vidal Flammarion.*Paris*.PP:753.
- [12] **Ganzina F. (1983).** 4 – épidoxorubicine, a new analogue of doxorubicin : a preliminary overview of prechemical and chemical data. *Cancer. Treat*. PP : 1-22.

- [13] **Gewirtz D.A. (1999).** Acritical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 57: 727-741.
- [14] **Garret R.H et Gresham C.M. (2000).** Biochimie. *De Boeck université. Paris.* PP: 371.
- [15] **Borel J.P., Randoux A., Gillery Ph., Bellon G., Maquart F.X., le Pench C Et Monboisse J.C. (1997).** Biochimie Dynamique. *de Beaock et larcier.* Belgique.PP :23.
- [16] **Binashi M., Bigioni M., Cipollone A., Rossi C., Goso C., Maggi CA., Capranico G., Animati F. (2001) .** Anthracyclines, selected new developments. *Curr. Med. chem.* .1:113-130.
- [17] **Binashi M., Farinosi R., Borgnetto M.E and Capranico G. (2000).** In vivo site specificity and human iso-enzyme selectivity of tow topoisomerase II. Poisoning anthracyclines. *Cancer. Res.* 60: 3770-3776.
- [18] **Benjamin R.C.(1995).** Rational for the use of mitoxantrone in the older patient: cardiac toxicity. *Semin.Oncol.*22 (1 suppl.): 3-11.
- [19] **Minotti G., Cairo G and Monti E. (1999).** Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song ? *Faseb.J.* 13: 199-212.
- [20] **Vasquez – vivar J., Martasek P., Hogg V., Masters B.S., Pritchard K.A.Jr., Kalyanaraman B. (1997).** Endothelial nitric oxide synthase dependent superoxide generation of adriamycin. *Biochemistry.* 36:11293-11297.
- [21] **Myers C.E. (1998).** The role of iron in doxorubicin. Induced cardiomyopathy. *Semin Oncol.* 25 (suppl. 10):10-14.
- [22] **Bourgeois C. (1995).** Rôle antioxydant des vitamines. In. I. F .N (Institut Français de Nitration), les vitamines. *Dossier scientifique N : 5 paris,* PP :100-105.
- [23] **Thomas D .pollard., William C., Earnshan. (2004).** Biologie cellulaire. Elsevier science. USA. PP: 820-824.

- [24] **Fornari Jr., F.A et al. (1994)**: Induction of differentiation and growth arrest associated with nascent (monoligosomal) , DNA fragmentation and reduced -C- myc expression in MCF -7 human breast tumor cells after continuous exposure to a sublethal concentration of doxorubicin. *Cell. Growth Differ.* 5 :723-733.
- [25] **Kono P.A.J. (1988)**. G₂ block induced by DNA cross linking agents and its possible consequences. *Biochem. pharmacol.* 37: 2303-2309.
- [26] **Ling Y.H et al. (1996)**. Cell cycle dependant cytotoxicity; G₂/M phase arrest, and disruption of P34^{cdc2} / cycling B₁ activity induced by doxorubicin in synchronized P₃₈₈ Cells .*Molpharmacol.* 49: 832-841.
- [27] **Dinnen R.D et al. (1993)**. An anticancer drug- Sensitive murine erythroleukemia clone : Implication for the mechanism of action of anti-neoplastic drugs .*Cancer Res.* 53 : 1877- 1882.
- [28] **Colombo et al. (1988)**. Dose dependence of doxorubicin effect on action assembly in vitro. *Exp.Mol .pathol.* 49 :297-304.
- [29] **Molinari A et al. (1990)**. Interaction of anthracycline antibiotics with cytoskeletal components of cultured carcinoma cells (CGS) *Exp. Mol. Pathol.* 53: 11-33.
- [30] **Fornari Jr., F.A et al. (1996)**. Growth arrest and mono- apoptotic cell death associated with the suppression of C-myc expression in MCF -7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin. *Biocham. Pharmacol.* 51: 631-940.
- [31] **Ito H., Miller S.C., Bellingham M.E., Akimoto H., Torti S.V., Wade R., Gahlamann R., Lyons G., Kebes L., Torti F.M. (1990)**. Doxorubicin Selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proc. Nath. Acad. Sic. USA.* 87 : 4275- 4279.
- [32] **Inagaki R et al. (1999)**. Anticancer drugs inhibit induction of NO synthase in rat in vivo. *Gen pharmacol.* 32: 185-188.
- [33] **Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. (1999)**. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during Apoptosis (in process citation). *Annu Rev, Biochem.* 68 : 383-424.

- [34] **Kamoun P., Lavainne A et Deverneuil H. (2003).** Biochimie et Biologie moléculaire. *Flammarion. France* .PP :436-447.
- [35] **Opferman J.T., Korsmyer S.J. (2003).** Apoptosis in the development and maintenance of the immune supstem. *Nature immunology*. 4: 410-415.
- [36] **Pelmont J. (1993).** Enzymes ; les sous produit de l'oxygène. *O.P.U. Alger*. PP : 515-542.
- [37] **Favier A. (2003).** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'activité chimique*. PP: 108-109.
- [38] **Lock R.B et Ross W.E., (1987).** DNA to-poisomerases in cancer therapy anticancer. *Drug DES*. 2: 151-164.
- [39] **Singal P.K., Kumar D., Denelisen I., Iliskovic N. (2000).** Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiologie and prevention. *Faseb.J*.11:931-936.
- [40] **Kwok J.C., Richardson D.R. (2003).** Anthracyclines induce accumulation of iron in ferrition in myocardial and neoplastic cells, inhibition of the ferrition iron mobilization pathway. *Mol pharmacol*. 63: 849-861.
- [41] **Speyer J.L., Green M.D., Zeleniuch J.A., Wernz J., Rey M., Sanger J., Kramer E., Ferrans V., Hochster H., Meyers M et al. (1992).** ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in woman with breast Cancer *J clin Oncol*. 10 :117-127.
- [42] **Schuchter L.M., Hensley M.L., Meropol N.G., Winer E.P. (2002).** American society of chemical oncology chemotherapy and radiotherapy. expert panel, update of recommendations for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. *J.clin. oncol*. 20 : 2895-2903.
- [43] **Doroshow J.H. (1995).** Role of reactive –Oxygen metabolism in the cardiac Toxicity of the anthracycline antibiotics: new analogues, methods of delivery and mechanisms of action. Priebe. W.ed. American chemical society, Washington DC. PP: 259-267.
- [44] **Doroshow J.H.,Hocker G.Y and Myers C.E. (1980).** Enzymatic defence of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *J. chin. Investig*. 65 : 128-135.

- [45] **Nohl H. (1987)**. Demonstration of the existence of an organospecific NADH dehydrogenase. In heart mitochondria . *Eur. J. Biochem*; 169: 585-591.
- [46] **Delbart C. (2000)**. Les mitochondries : biologie et incidences physiopathologiques. *Tec Doc. Londres. Paris-New York* . PP: 111-113.
- [47] **Karp G., (2004)**. La respiration aérobie et la mitochondrie. Biologie cellulaire et moléculaire. *De Boeck university. Paris*. PP : 183-213.
- [48] **Walker U.A., Bickel M., Liitke Volksbeck S.I et al. (2000)**. Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor. Associated genetic And structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV. *Infected Patients*. 29 :117-121.
- [49] **Olson R.D., Mushlin P.S. (1990)**. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *Faseb.J.* 4:3076-3086.
- [50] **Papadopoulou L.C., Theophilidis G., Thomopoulos G.N and Tsiftoglou AS. (1999)**. Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin induced cardiomyopathy in mice : suppression of cytochrome C oxydase II gène expression. *Biochem pharmacol.* 57 : 451-489.
- [51] **Skladanowski A. (1993)**. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumor cells. *Biochem.pharmacol.*46 : 375-382.
- [52] **Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A. et Rodwell N.W. (2000)**. Biochimie de Harper. *Les press de l'université. Laval. Belgique*. Ed. 25. PP: 141-143.
- [53] **Chance B., Williams G.R., (1955)**. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J.Bial. chem* .217 : 93-385.
- [54] **Nicolay K., de Kruijff B. (1987)**. Effects of adriamycin on respiratory chain activities in mitochondria from rat liver, rat heart and bovine heart. Evidence for a preferential inhibition of complex III and IV. *Biochim. Biophys. Act.* 892: 30-320.
- [55] **Bianchi C., Bagnato A., Paggi M.G., Floridi A . (1987)**. Effect of adriamycin on electron transport in rat heart, liver , and tumor mitochondria. *Exp. Mol. Pathol.* 46 : 35-123.

Encadreur : MR Atyane Mohamed Présenté par: Bahi Hayette- Djini Fahima-Boucherguine Nabila.
Examinatrice : Melle Bousnane Hananen Nadia

Anthracyclines : Cytotoxicité, cardiotoxicité et radicaux libres oxygénés.

Résumé :

Les anthracyclines sont des agents chimiothérapeutiques très efficaces, largement utilisés dans le traitement de différente tumeur (cytotoxicité). Cependant, la cardiotoxicité limite leur utilisation.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette cardiotoxicité dont le plus important reste la génération de ROS.

Enfin la mitochondrie reste de loin l'organite le plus sensible aux effets secondaires de ces médicaments et semble être le point de départ de cette toxicité.

Mots clés : Anthracyclines, cytotoxicité, cardiotoxicité, radicaux libres.

Abstract :

Anthracyclins are the most potent chemotherapeutic agents for the treatment of different types of tumours (cytotoxicity). However, the use of these compounds is limited by the risk of cardiotoxicity.

Several mechanisms are proposed in order to explain this cardiotoxicity, which the most important still the generation of ROS.

The mitochondria is the most sensitive organit to the secondary effects of these medicines and it may be origine of this cardiotoxicity.

Key words: Anthracyclins, cytotoxicity, cardiotoxicity, free radicals.

الملخص:

الأنتراسيكلين هي عبارة عن أدوية جد فعالة، واسعة الاستعمال في مجال المعالجة الكيماوية لمختلف أنواع السرطان بفصل سميتهما الخلوية، لكن سميتهما على القلب تحد من استعمالها. اقترحت عدة آليات لشرح هذه السمية على القلب وتبقى الآلية المهمة هي تخليق الجذور الحرة. تبقى الميتوكوندري العضية الأكثر حساسية للتأثيرات الجانبية لهذه الأدوية ويبدو أنها المسؤولة عن بداية السمية القلبية.

الكلمات المفتاحية: الأنتراسيكلين، السمية الخلوية، سمية القلب، الجذور الحرة.