

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1994



THESE N° 365

APPORT DE L'ETUDE SPECTROPHOTOMETRIQUE
DANS LA CONNAISSANCE DES LIAISONS ADN-
INTERCALANTS ADN : APPROCHE DE LA
FORMATION D'UN COMPLEXE PAR TRANSFERT DE
CHARGE ENTRE ADN ET INTERCALANTS ADN

THESE

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 1994

par

Emmanuelle RIVOIRE

née le 28 janvier 1970 à Limoges (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur J. F. LAGORCE, Maître de conférences
Madame D. DENIS, Pharmacien
Monsieur J. FATIMI, A.T.E.R.

Président
Juge
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

Monsieur DREYFUSS Gilles – Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
LEFORT DES YLOUSES Daniel	PHARMACIE GALENIQUE
MOESCH Christian	HYGIENE
NICOLAS Jean-Albert	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE PARASITOLOGIE
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
PENICAUT Bernard	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE – CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A notre président et directeur de thèse,

Monsieur J.F. LAGORCE,

*Maître de Conférences,
de Chimie Organique et de Chimie Thérapeutique,
Habilité à Diriger les Recherches ;*

Vous nous avez inspiré le sujet de cette thèse, et vous vous êtes toujours rendu disponible pour apporter vos précieux conseils indispensables à la réalisation de ce travail.

Vous nous faites, en outre, l'honneur de présider ce jury.

Veillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

A nos juges,

Madame D. DENIS,

Pharmacien - Le Palais sur Vienne ;

Vous nous avez toujours réservé un accueil chaleureux dans votre officine, et vous avez accepté de nous accompagner lors de cette dernière étape vers la vie professionnelle.

Soyez assurée de notre reconnaissance et de toute notre amitié.

Monsieur J. FATIMI,

*Docteur d'état ès Sciences, option Pharmacie,
Attaché Temporaire d'Enseignement et Recherche ;*

Vous avez spontanément accepté de juger ce travail.

Nous sommes flattés de vous compter aujourd'hui parmi nos juges.

A toute ma famille,

A tous mes amis,

Merci de votre confiance, de vos encouragements, du soutien que vous avez apportés tout au long de ces études.

Avec toute mon affection.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : LE CANCER

1.1 Introduction

1.2 Définition

1.3 La cellule cancéreuse

1.4 Classifications des cancers

1.5 Les facteurs de la cancérisation

DEUXIEME PARTIE : LES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX

2.1 Le cycle cellulaire

2.2 Les médicaments anticancéreux

2.2.1 Médicaments anticancéreux et cycle cellulaire

2.2.2 Mécanisme d'action des anticancéreux

TROISIEME PARTIE : MISE EN EVIDENCE DE COMPLEXES PAR TRANSFERT DE CHARGE ENTRE ADN ET INTERCALANTS ADN

3.1 Introduction

3.2 Méthodologie

3.2.1 Etude de l'ADN

3.2.2 Les substances intercalantes utilisées

3.2.3 Méthode de détection

3.2.4 Protocole expérimental

3.3 Résultats

3.3.1 Etude de quatre substances intercalantes

3.3.2 Discussion

CONCLUSION

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La terminologie « cancer », étymologiquement du latin « cancri » signifiant crabe, lui-même dérivé d'un ancien mot indien « cranti » évoquant une action de lacérer, déchiqueter, tuer, fut la première fois employée par un médecin latin du siècle d'Auguste.

Pendant longtemps, par son essence même, ce mot a évoqué une affection sournoise.

Les mécanismes de cancérisation sont aujourd'hui connus, mais restent encore trop souvent impossibles à maîtriser : modification au niveau d'un gène cellulaire,...

D'autre part, d'énormes progrès ont été réalisés ces quinze dernières années au niveau de la chimiothérapie anticancéreuse ; le mode d'action des substances anticancéreuses est actuellement parfaitement déterminé.

L'activité anticancéreuse des intercalants ADN résulte de leur aptitude à s'intercaler entre les paires de bases puriques et pyrimidiques lors de la réplication de l'ADN, établissant ainsi avec cette macromolécule des liaisons covalentes.

Nous avons voulu étudier, si, de par les structures mêmes de l'ADN et des molécules intercalantes à caractère électrophile, il ne serait pas possible de former un complexe par transfert de charge ADN - intercalant ADN.

Après avoir défini le cancer d'un point de vue biochimique et cellulaire, exposé les agents cancérogènes ou mutagènes, nous nous attacherons dans ce travail à détailler les différentes classes anticancéreuses et leur mode d'action.

Enfin, dans une troisième partie, nous développerons les hypothèses de départ sur la formation de liaisons autres que covalentes entre ADN et intercalants ADN, la mise au point du protocole expérimental, et les résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE

1. PREMIERE PARTIE : LE CANCER

1.1 INTRODUCTION

Le cancer est un bien vaste sujet, abordé dans de nombreux ouvrages et qui peut être appréhendé de différentes manières.

C'est pourquoi, nous nous attacherons, dans cette première partie à envisager le **cancer** et la **cellule cancéreuse** non pas sous un aspect médical et clinique mais plutôt d'un niveau biochimique et cellulaire.

Après avoir défini succinctement le cancer, nous détaillerons ce qu'est une cellule cancéreuse, ses caractéristiques ; nous évoquerons ensuite deux des classifications courantes et terminerons par la description des agents cancérogènes et mutagènes.

1.2 DEFINITION [2, 18]

Le cancer est le résultat de la prolifération d'une famille, d'un clône de cellules anormales.

Une cellule cancéreuse est une cellule qui a subi une transformation telle qu'elle reste vivante et capable de se diviser, mais telle que ses divisions ne soient plus entièrement contrôlées par les messages directs ou indirects de l'organisme.

La division de la cellule cancéreuse est devenue partiellement ou totalement autonome, indépendante des règles de la vie en société des cellules, et cette transformation est transmissible aux cellules filles de la cellule cancéreuse.

On groupe ainsi sous le terme de cancer les affections dans lesquelles un ensemble de cellules, au sein d'un organisme pluritissulaire, échappe aux mécanismes de régulation, assurant un équilibre entre les tissus, compatible avec la vie.

Le cancer est en France la deuxième cause de mortalité immédiatement après les maladies cardio-vasculaires.

1.3 LA CELLULE CANCEREUSE

1.3.1 Origine

1.3.1.1 Introduction [3]

Lorsqu'une cellule entre en cancérisation, elle acquiert des comportements très anormaux.

Une tumeur cancéreuse est en fait une grosse masse formée de cellules modifiées qui descendent toutes d'une seule cellule fondatrice ; cette dernière était à l'origine une cellule normale qui sous l'influence de facteurs externes ou internes à l'organisme s'est transformée en une cellule maligne, génératrice de la masse tumorale.

En effet, cette cellule modifiée subit des divisions de façon anarchique donnant naissance à des cellules qui tendent à s'indifférencier, c'est à dire à prendre un aspect plus embryonnaire que celles du tissu qui leur a donné naissance.

L'ensemble des données cliniques et expérimentales permet d'affirmer que le processus de cancérisation comporte plusieurs étapes ; ce développement tumoral qui évolue par paliers est appelé : **progression néoplasique**.

1.3.1.2 Les étapes de la cancérisation [1,24]

On envisage deux événements dans l'histoire naturelle d'un cancer :

- une phase infra-clinique, occulte, qui précède :
- une phase clinique avec émergence et évolution de la tumeur.

1.3.1.2.1 La phase infra-clinique

Elle est constituée par la succession mais en même temps la complémentarité de deux événements : initiation et promotion.

L'**initiation** est la transformation irréversible par un ou plusieurs agents cancérigènes d'une cellule normale en une cellule potentiellement maligne. Cette phase est irréversible mais ne peut à elle seule induire un cancer.

Il faut lui associer une phase de **promotion** qui est la prolifération de la cellule potentiellement maligne sous l'action des agents carcinogènes, appelés alors promoteurs.

Cette phase infra-clinique ou précancérisation est concrètement assez difficile à définir.

Les cellules à la fin de ce stade sont capables de former des tumeurs qui, quelquefois, regressent spontanément.

Ce stade peut être réversible si les gènes de la réparation ont le temps d'agir, car ils entrent en compétition avec un certain nombre de facteurs qui augmentent le risque de développer un cancer :

- l'exposition aux agents mutagènes, carcinogènes ;
- la notion de terrain est importante à considérer car l'efficacité des systèmes immunitaires, des systèmes de réparation de l'ADN décide de la réversibilité de cette phase ;
- avec l'âge, les carcinogènes s'accumulent et les systèmes réparateurs sont de moins en moins efficaces.

A ce stade, on est en présence de cellules à **génotype néoplasique**.

1.3.1.2.2 La phase clinique

Les cellules à génotype cancéreux fabriquent et sécrètent des facteurs de croissance modifiés par rapport à ceux de l'embryogénèse.

Ces cellules s'autorégulent, s'autostimulent, oublient les régulations externes et perdent l'inhibition de croissance. La prolifération aboutit à une lignée cellulaire autonome ayant les caractères de la cellule initiale.

Le cancer est donc créé au sein des tissus et forme une tumeur primitive. Celle-ci est d'abord microscopique et respecte l'intégrité de la membrane basale de l'épithélium. Ensuite, les cellules parviennent à rompre la membrane basale et à pénétrer dans le tissu conjonctif sous-jacent ; elles entrent alors en contact avec les réseaux sanguins et lymphatiques et des cordons cellulaires vont alors se fixer sur les ganglions lymphatiques, les envahir, les rendant immunologiquement déficients.

L'extension métastatique se fait alors en plusieurs étapes : migration de quelques cellules cancéreuses par voie sanguine, puis colonisation des organes où s'établissent les métastases.

Les localisations préférentielles des métastases dans l'organisme sont certainement dues à des facteurs anatomiques (importance du réseau veineux) ou purement mécanique (résistance moindre).

1.3.2 Caractéristiques des cellules cancéreuses

1.3.2.1 Morphologie [7]

Une cellule cancéreuse ne possède pas de caractères morphologiques rigoureusement spécifiques. Cependant, quelques caractères différents de ceux de la cellule normale sont à souligner ; ils concernent :

* **taille de la cellule** : la cellule tumorale est de taille variable, augmentée ou diminuée : ceci constitue l'**anisocytose** ;

* **aspect du noyau** : le noyau est lui aussi irrégulier de par son aspect, sa taille et ses composants ; on parle d'**anisocaryose** ;

* **aspect du nucléole** : il est hypertrophié, parfois même le nombre de nucléoles augmente ou plus rarement diminue ;

* **les chromosomes** : ils sont également affectés ; le plus souvent, leur nombre est augmenté : on parle de **polyploïdie**. D'autres anomalies sont parfois rencontrées : la forme du chromosome, le mode de réplication ou la vitesse de migration vers les pôles de la cellule peuvent être anormaux ;

* **aspect du cytoplasme** : le cytoplasme est fréquemment basophile ; son volume, moins augmenté que celui du noyau, explique l'inversion du rapport nucléoplasmique de la cellule néoplasique par rapport à la cellule normale ;

* **aspect des mitochondries** : il peut y avoir modification du nombre de mitochondries, de leur taille, de leur forme ou de la disposition des crêtes.

1.3.2.2 Différences entre la cellule cancéreuse et la cellule normale [3,24]

Des études menées sur des cellules nerveuses *in vitro*, en présence d'agents cancérogènes, ont permis de suivre les étapes de la transformation d'une cellule saine en cellule néoplasique et de conclure quant aux caractères de chacune d'elles.

Il existe trois différences essentielles entre une cellule normale et une cellule cancéreuse.

- **Immortalité** : c'est la capacité indéfinie de prolifération.

En effet une cellule normale se multiplie *in vitro* si on lui apporte les éléments et les facteurs humoraux nécessaires à sa prolifération. Mais ce nombre de divisions est limité ; quand il a été atteint les descendants dégénèrent et meurent.

La première étape de la cancérisation est la levée de cet interdit, que l'on appelle l'immortalisation ; le nombre de divisions est alors illimité, la prolifération de la masse tumorale se faisant de façon anarchique.

- **Autonomisation de la division cellulaire.**

Contrairement à la cellule normale qui ne se multiplie que lorsqu'elle en a reçu l'ordre, la cellule cancéreuse a perdu les capacités de communication avec les inhibiteurs qui régissent la division cellulaire de la cellule normale.

La cellule néoplasique se multiplie à son propre rythme et le tissu cancéreux s'accroît régulièrement, alors qu'il reste stable dans les tissus normaux.

- **Infiltration, migration.**

La cellule saine entretient, avec les cellules voisines, des relations qui influencent son devenir.

Les cellules cancéreuses qui se multiplient de façon totalement anarchique ne reconnaissent plus les cellules des tissus environnants, acquièrent la possibilité de détruire les membranes basales et d'envahir les tissus voisins ; elles deviennent capables de se détacher de leur environnement, de migrer et de donner naissance à des métastases.

1.3.2.3 Biochimie des cellules cancéreuses

Les modifications biochimiques des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales ont été longuement étudiées sur des cellules en culture, en présence de virus transformant tel que le *Rous sarcoma virus* (RSV) [3].

De nombreuses études ont été initialement conduites (sur des cellules transformées par RSV) lors de la transformation cellulaire, mais il faut garder à l'esprit que la plupart des oncogènes entraînent en fait des modifications similaires.

Nous allons décrire les caractéristiques biochimiques des cellules transformées *in vitro*.

1.3.2.3.1 Echappement aux mécanismes normaux de contrôle de la croissance.

Les cellules normales ont besoin d'être attachées à un substrat avant de pouvoir entrer en mitose (ce phénomène est connu sous le nom de croissance dépendante de l'ancrage), et elles arrêtent de se diviser une fois que la culture cellulaire a complètement recouvert le support de culture.

Les cellules transformées n'ont pas un besoin impératif de support solide ; elles peuvent aussi continuer à se diviser une fois que ce dernier est complètement recouvert ; elles présentent des besoins réduits en facteurs de croissance comparativement aux cellules normales.

1.3.2.3.2 Modifications métaboliques.

- Métabolisme du glucose : les cellules transformées présentent fréquemment un accroissement de la captation et du métabolisme du glucose.

- Modifications des systèmes enzymatiques : des modifications importantes sont l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc, due probablement à une stimulation de l'adénylate cyclase et une stimulation de l'activité de la phosphatidyl-inositol kinase.

D'autre part, la cellule cancéreuse perd certains systèmes enzymatiques tels que ceux permettant la synthèse de l'asparagine.

1.4 CLASSIFICATIONS DES CANCERS

Il est difficile de donner une classification simple et parfaite des cancers sachant que ce seul mot "cancer" a, à lui seul, des significations différentes selon le système de référence choisi [6].

Ainsi, pour le médecin, le mot cancer évoque l'évolution d'une tumeur qui détruit localement et à distance les organes sains de l'individu qui en est atteint.

Pour l'historien, le mot cancer évoque un tissu néoformé qui infiltre les structures saines dans lesquelles il est né.

Pour le biologiste, les cellules cancéreuses sortent du cadre normal de différenciation, multiplication et de régulation observées dans un organisme sain.

Théoriquement, n'importe quelle cellule de n'importe quel tissu peut devenir cancéreuse. L'organisme étant composé de nombreux organes, eux-mêmes souvent composés de plusieurs tissus ou types cellulaires, on conçoit la diversité des lésions que l'on va réunir sous le terme "cancer" et la nécessité de classifications [18].

1.4.1 La classification TNM

La classification TNM utilisée en cancérologie clinique est importante à citer ; elle est utilisée pour classer les tumeurs malignes avant tout traitement.

Le système est basé sur la description de l'extension anatomique de la maladie cancéreuse en tenant compte de trois paramètres :

T : taille et extension de la tumeur primitive appréciées par la palpation ;

N : état des ganglions lymphatiques régionaux ;

M : absence ou présence de métastases.

L'extension de la tumeur primitive est indiquée de T1 à T4, en tenant compte de la taille et de l'envahissement supposé des tissus voisins.

Les ganglions drainant la tumeur sont décrits en allant de N0 à N4 ;

N0 : les ganglions ne sont pas palpables ;

N1 : ils sont palpables ;

N1a : ils sont palpables mais jugés non envahis ;

N1b : ils sont palpables et jugés envahis ;

N>1 : ne se réfère pas à la taille des ganglions mais à l'atteinte supposée de plusieurs aires ganglionnaires et à l'extension aux tissus voisins.

Si une étude histologique est réalisée, le sigle + signifie invasion histologique, - absence d'invasion.

Exemple : N1b- signifie donc ganglions palpables, cliniquement jugés envahis, histologiquement non envahis.

M0 signifie que l'on n'a pas décelé de métastases à distance, M1 que l'on croît avoir décelé de telles métastases.

1.4.2 Classification anatomopathologique

Nous allons maintenant détailler une classification anatomopathologique, dont le principe est de regrouper les cancers en fonction du tissu dont ils sont issus. Schématiquement, on distingue les tumeurs solides et les hémopathies malignes.

1.4.2.1 Les tumeurs solides

On peut les répartir en cinq grands groupes.

1.4.2.1.1 Carcinomes (épithéliomas)

Leur point de départ est un épithélium. Ils représentent environ 90 p. 100 de tous les cancers. Selon l'épithélium, on en décrit plusieurs types.

a. **Carcinomes malpighiens ou épidermoïdes** : ils ressemblent à l'épithélium de Malpighi.

b. **Adénocarcinomes** : leur point de départ est un épithélium glandulaire. Ils naissent de tous les revêtements muqueux cubocylindriques, avec leurs glandes et dans tous les organes glandulaires, qu'ils soient endocrines ou exocrines.

c. **Carcinomes excréto-urinaires ou transitionnels** : ils sont encore nommés paramalpighiens ou urothéliaux. Ils se cantonnent, sauf exception, dans les voies urinaires excrétrices.

1.4.2.1.2 Sarcomes

Ce sont des tumeurs de structure mésenchymateuse, le plus souvent unitissulaires. Selon leur tissu d'origine, on distingue les fibrosarcomes, les liposarcomes, les myosarcomes, les ostéosarcomes,...

1.4.2.1.3 Tumeurs à structure neuroectoblastique

Elles sont séparées en deux groupes :

a. **Tumeurs neuroectodermiques proprement dites** : ce sont les tumeurs du système nerveux central, spécialement de la névroglie (gliome) et du revêtement des cavités cérébrospinales (épendymome, tumeurs des plexus choroïdes).

b. **Tumeurs mésectodermiques** : ce sont les tumeurs des méninges (méningiome), celles des ganglions nerveux sympathiques et parasymphatiques (sympathome embryonnaire, ganglioneurome, chémodectome), celles des gaines de Schwann (schwannome), celles du système mélanogénique (mélanome malin) ou celles du système endocrinien diffus.

1.4.2.1.4 Tumeurs de structure embryonnaire, uni- ou pluritissulaires

Elles sont plus ou moins matures et portent d'une manière générale le nom de **dysembryomes**. Parmi les moins matures, signalons les tumeurs indifférenciées telles que le neuroblastome et le néphroblastome. A l'opposé, les tumeurs très différenciées et matures forment des tératomes dont le type est le kyste ovarien bénin. Entre les deux, existent toutes les formes intermédiaires.

1.4.2.1.5 Tumeurs de structure composite, uni- ou pluritissulaires

Elles sont formées de structures diverses associées ou semblent même présenter des formes de transition :

- épithéliales (carcinome mixte épidermoïde et glandulaire) ;
- mésenchymateuses (mésenchymome) ;
- épithéliomésenchymateuses (tumeur mésodermique maligne).

1.4.2.2 *Cancers des organes hématopoïétiques*

Les affections sont généralement séparées en deux catégories : [3]

- **les lymphomes malins** : lymphomes malins non hodgkiniens et maladie de Hodgkin ;
- **les leucémies** : classées en fonction du type de globules blancs qui prolifèrent et du caractère évolutif de la maladie.

1.4.2.2.1 Les lymphomes malins

a. Le terme "**lymphomes malins non hodgkiniens**", anciens lymphosarcomes, désigne un groupe hétérogène de maladies malignes développées à partir de cellules lymphoïdes.

Les lymphomes malins non hodgkiniens représentent donc un ensemble d'entités anatomo-cliniques diverses, au pronostic parfois très différent. Le groupement est justifié par les caractères cliniques et la présentation habituellement tumorale et ganglionnaire de la maladie.

Un lymphome malin non hodgkinien peut donc se développer dans n'importe quel organe (tube digestif, moëlle osseuse, peau, système nerveux central, gonades, oeil, thyroïde, poumon,...) ou l'envahir secondairement.

Deux classifications anatomo-pathologiques-diagnostic sont actuellement proposées.

- Classification de Kiel :

Classification de Kiel : 1978 actualisée en 1988	
Lymphomes B	Lymphomes T
Lymphomes malins de faible malignité	
LM Lymphocytaire (LLC B, Leucémie à tricholeucocytes)	LM Lymphocytaire (LLC, mycosis fongoide, syndrome de Sezary, LM des zones T)
LM lymphoplasmocytaire	
LM plasmocytaire	
LM centrocytique diffus	LM pleiomorphe à petites cellules
Lymphomes malins de grande malignité	
LM centroblastique	LM pleiomorphe à grandes cellules
LM immunoblastique	LM immunoblastique
LM à grandes cellules anaplasiques	LM à grandes cellules anaplasiques
LM lymphoblastique	LM lymphoblastique
LM de Burkitt	

figure n°1 : La classification de Kiel [6].

La classification de Kiel a été réactualisée en 1988 par la séparation des lymphomes de phénotype T de ceux de phénotype B [3].

- La "working formulation" :

La working formulation 1980
Faible malignité
LM à petits lymphocytes compatibles avec LLC, plasmocytoïde
LM folliculaire avec prédominance de petites cellules clivées
LM folliculaire mixte à petites et grandes cellules
Malignité intermédiaire
LM folliculaire avec prédominance de grandes cellules
LM diffus à petites cellules clivées
LM diffus mixte à petites et grandes cellules
LM diffus à grandes cellules
Grande malignité
LM à grande cellules immunoblastiques
LM lymphoblastique
LM de Burkitt ou de type Burkitt
Divers
mycosis fongoide
histiocytique
plasmocytome extramedullaire
composite
inclassables
autres

figure n°2 : La Working Formulation : formulation à usage clinique [6].

b. **La maladie de Hodgkin** est une affection maligne touchant essentiellement la trame réticulo-endothéliale des ganglions lymphatiques. La propagation de la maladie de Hodgkin est habituellement régulière à l'intérieur du système lymphatique, de proche en proche, d'un ganglion aux ganglions voisins. Ce n'est qu'à un stade évolué qu'a lieu une propagation sanguine qui aboutit principalement à des extensions splénique, hépatique, médullaire.

1.4.2.2.2 Les leucémies

Une leucémie correspond à une prolifération maligne de leucocytes dans le sang.

On distingue les **leucémies lymphoïdes** (atteinte de la lignée lymphocytaire), les **leucémies myéloïdes** (atteinte de la lignée granulocytaire issue de la moëlle osseuse essentiellement). Ces deux formes de leucémies ont une évolution longtemps chronique.

Les **leucémies aiguës** sont caractérisées par la rapidité de leur évolution et le caractère immature des cellules qui prolifèrent : ce sont des blastes, éléments les plus jeunes de la lignée blanche.

a. Leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique est une prolifération maligne monoclonale de lymphocytes murs, le plus souvent lymphocytes B, incapable de différenciation complète.

Le lymphocyte de la leucémie lymphoïde chronique a une morphologie le plus souvent comparable à celle du petit lymphocyte normal.

Les lymphocytes leucémiques présentent une importante raréfaction des déterminants normaux de la membrane plasmique par rapport aux lymphocytes normaux ; notamment les troubles de l'excrétion des immunoglobulines synthétisées expliquent la fréquente hypogammaglobulinémie et l'absence habituelle de pic monoclonal.

La leucémie lymphoïde chronique apparaît donc comme une accumulation de lymphocytes à immunocompétence altérée plutôt que comme une prolifération de ces cellules.

Les signes cliniques sont les conséquences d'une hypertrophie de tout le système lymphoïde : adénopathies, splénomégalie. Dans la plupart des cas, le tableau clinique se limite à ce syndrome splénoganglionnaire.

b. Leucémie myéloïde chronique

La leucémie myéloïde chronique est une prolifération des éléments myéloïdes de la moëlle osseuse portant essentiellement sur les éléments granuleux.

Cette affection est due à une anomalie acquise monoclonale d'une cellule souche très primitive.

Les signes cliniques en sont la splénomégalie, parfois accompagnée d'hépatomégalie, d'hyperleucocytose ; on retrouve souvent chez les sujets atteints un marqueur chromosomique caractéristique : le chromosome Philadelphie.

c. Leucémies aiguës

Les leucémies aiguës sont caractérisées par la prolifération maligne de cellules jeunes peu ou pas différenciées : les blastes.

Selon que ces blastes évoquent le lymphoblaste ou le myéloblaste, on parle de leucémie lymphoblastique ou myéloblastique.

Leur physiopathologie associe un excès dans la moëlle de précurseurs immatures et anormaux de cellules myéloïdes ou lymphoïdes et un déficit important des éléments sanguins normaux dû à un blocage de la maturation au stade de précurseurs.

Les signes cliniques découlent des faits précédents :

- signes liés à l'insuffisance médullaire :
 - . la granulopénie peut engendrer des localisations infectieuses, pulmonaires, ORL, ... ;
 - . l'anémie peut être responsable d'une pâleur importante associée à une asthénie intense
 - . un syndrome hémorragique dû à la thrombopénie (hémorragies cutanéomuqueuses).

- signes liés à l'infiltration blastique : hépatomégalie, splénomégalie,

adénopathies, sont les signes les plus fréquemment rencontrés. Un syndrome osseux douloureux est un signe d'appel fréquent, une atteinte cutanée, une hypertrophie amygdalienne ou gingivale sont observées moins fréquemment.

La classification FAB établie en 1976 repose sur les aspects morphologiques des blastes sur frottis de sang et de moëlle osseuse.

- On distingue trois types de leucémies aiguës lymphoblastiques L1 ,L2 ,L3 en utilisant des caractères propres aux cellules blastiques : taille de la cellule, aspect de la chromatine, rapport nucléocytoplasmique, présence de nucléoles, basophilie du cytoplasme.

- Six types de leucémies aiguës myéloblastiques (LAM 1 à 6) sont individualisés selon le degré de maturation des cellules blastiques et la différenciation vers une ou plusieurs lignées cellulaires.

1.5 LES FACTEURS DE LA CANCERISATION

Dans la majorité des cas, les cancers surviennent de façon apparemment spontanée ; aucun agent étiologique ne peut être mis en évidence. Cependant, les progrès de la recherche ont permis de découvrir de nombreux facteurs qui contribuent à créer, chez un sujet donné, une situation favorable à l'éclosion d'un cancer : c'est le cas des cancers pulmonaires dus au tabac.

La connaissance des facteurs de risque est fondamentale car elle permet la prévention et le dépistage d'une population à haut risque.

De façon classique, nous envisagerons les facteurs de risque endogènes puis exogènes.

1.5.1 Facteurs de risque endogènes ou propres à l'homme [5, 3]

1.5.1.1 Facteurs génétiques

Les cancers héréditaires et les maladies héréditaires qui prédisposent aux tumeurs malignes ne sont plus considérés comme des curiosités sans intérêt pour la prévention ou la

compréhension de leurs mécanismes d'apparition.

On a observé une fréquence accrue de certains cancers dans une même famille : cancer recto-colique, cancer du sein, cancer de l'ovaire, cancer bronchique, mélanome malin, cancer gastrique, leucémies essentiellement aiguës, lymphomes malins hodgkiniens et non hodgkiniens.

1.5.1.2 Facteurs hormonaux

Certains déséquilibres endocriniens semblent exercer une stimulation hormonale excessive, favorable à l'apparition de cancers, soit de la glande en cause, soit de l'organe cible : tumeurs du sein induites par une sécrétion excessive d'estrogènes.

La liaison entre hormones et transformation tumorale pourrait être réalisée par plusieurs mécanismes dont certains sont purement théoriques :

- modification de la production de cancérogènes endogènes ;
- modification du métabolisme des cancérogènes ;
- modification de la susceptibilité d'un tissu aux cancérogènes ;
- stimulation de la progression tumorale ;
- modification des capacités de l'organisme à "éliminer" des cellules tumorales.

En outre, l'observation clinique permet de penser que des facteurs endocriniens (stéroïdes sexuels) sont étroitement liés à deux localisations tumorales : les cancers de l'endomètre et du sein.

Adénocarcinome de l'endomètre : des études précises ont montré que l'on pouvait associer excès d'estrogènes endogènes (ou déficit en progestérone) et risque de cancer de l'endomètre.

Cancer du sein : l'adénocarcinome mammaire est la tumeur maligne la plus fréquente chez la femme occidentale. L'épidémiologie du cancer du sein est très discutée. Les facteurs de risque admis sont l'âge, un antécédent personnel de cancer du sein, et les épisodes de la vie génitale (indissociable de l'environnement hormonal).

Cependant, l'avis général est que les hormones naturelles ne sont pas en elles-même directement cancérogènes mais qu'elles interviennent en régulant multiplication et différenciation des populations cellulaires des tissus cibles normaux. De même, certaines hormones pourraient favoriser (ou inhiber) la multiplication des populations cellulaires tumorales et donc faciliter (ou freiner) l'évolution infra-clinique ou clinique tumorale.

1.5.1.3 Facteurs immunologiques

Nous avons déjà vu lors de l'étude des étapes de la cancérisation que la phase de promotion naissait entre autres d'un débordement du système immunitaire de l'hôte. Ceci sous-entend que les cellules cancéreuses initiales seraient antigéniques et donc reconnues et éliminées par le système immunitaire.

Trois sortes d'antigènes spécifiques aux tumeurs ont été mis en évidence chez l'homme :

- antigènes attachés à la surface de la cellule cancéreuse ;
- antigènes intérieurs au cytoplasme ou au noyau ;
- antigènes circulants, produits par la tumeur.

Parmi les facteurs endogènes, responsables d'une défaillance du système immunitaire, on peut citer des raisons d'ordre génétique : un nombre anormalement élevé de cancers est observé dans une population atteinte d'un déficit immunitaire congénital par rapport à la population normale.

La recrudescence des cancers observés avec l'âge pourrait être expliquée par la lente dépression des fonctions immunitaires qui se produit à cette époque de la vie.

1.5.1.4 Autres facteurs endogènes

Plusieurs classes de substances produites dans l'organisme sont inductrices ou promotrices chez l'animal, ou mutagènes *in vitro*. Certaines sont strictement endogènes, d'autres sont le produit du métabolisme dans l'organisme de substances exogènes ; dans ces catégories, on peut citer les sels biliaires, les composés nitrés, certains métabolites du tryptophane et de la tyrosine.

Leur rôle précis dans la cancérogénèse chez l'homme n'est pas connu ; la responsabilité de certains métabolites des sels biliaires a été proposée dans la genèse des cancers coliques.

1.5.2 Facteurs de risque exogènes ou extérieurs à l'homme

Les facteurs sont nombreux et peuvent être répartis en trois groupes : les carcinogènes chimiques, physiques et les virus [6].

1.5.2.1 Carcinogènes chimiques [3]

Les substances cancérogènes peuvent être réparties en deux classes : les produits directement actifs, ceux qui doivent être métabolisés ou procancérogènes.

Cependant, tous les carcinogènes chimiques sont eux-mêmes ou vont donner naissance, à des radicaux électrophiles qui pourront provoquer trois types de mutation (modification héréditaire du patrimoine génétique) :

- **les mutations ponctuelles** : il y a substitution d'une base par une autre, ou ajout de plusieurs bases au milieu du brin d'ADN ;
- **les mutations chromosomiques** : elles affectent la structure du chromosome ou le nombre de chromosomes ;
- **les mutations affectant le système SOS ADN** qui est le système de réparation de l'ADN.

1.5.2.1.1 Les cancérogènes directs

Ces substances possèdent la propriété de participer directement aux réactions clés de la cancérisation cellulaire en devenant spontanément réactives avec les macromolécules.

Leur plus ou moins grand pouvoir cancérogène dépend d'une part de la capacité de l'organisme à réaliser une détoxification rapide (inactivation enzymatique et élimination), d'autre part de la quantité de substance cancérogène susceptible de se trouver au contact du tissu cible.

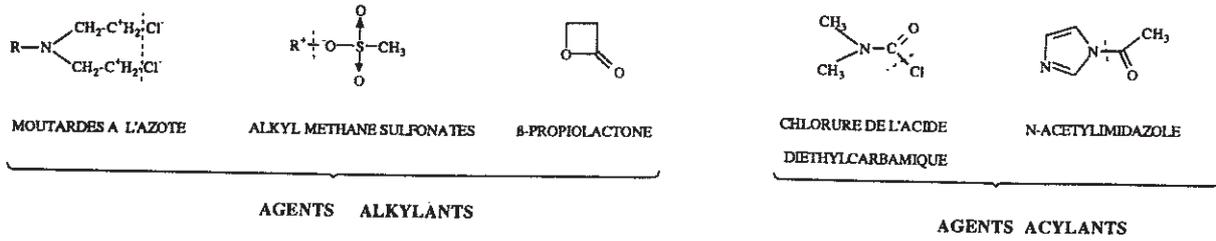


figure n°3 : Les cancérigènes directs [3].

On peut rapprocher de ces substances cancérigènes certains métaux : magnésium, manganèse, titane, fer, cobalt, nickel, argent, cadmium, zinc, étain, qui donnent des ions électrophiles et qui peuvent réagir avec la guanine et les phosphates des acides nucléiques [6].

1.5.2.1.2 Les procancérigènes

La plupart des composés cancérigènes chimiques ne sont pas réactifs en eux-mêmes ; ils doivent d'abord être transformés en composés réactifs capables de réagir avec les macromolécules cellulaires selon le schéma :

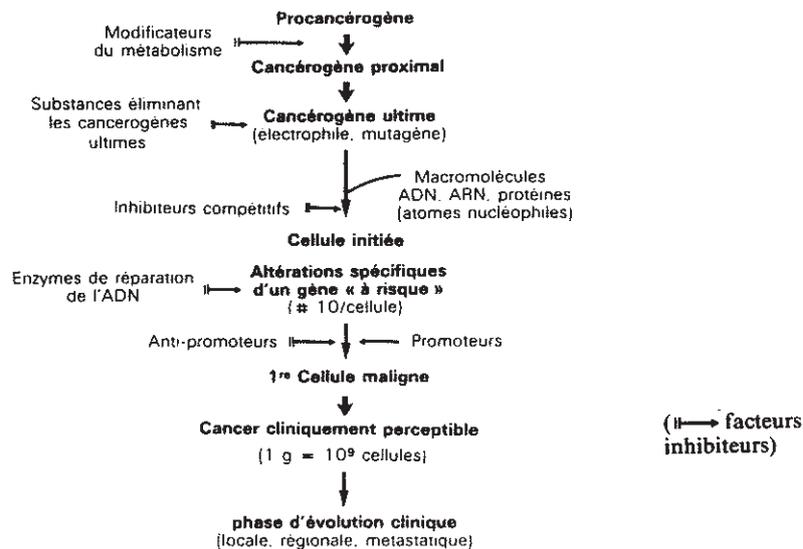


figure n°4 : Différentes étapes de la cancérogénèse chimique) [6]

Nature des procancérogènes : les procancérogènes peuvent être des produits naturels, des produits de synthèse ou de combustion.

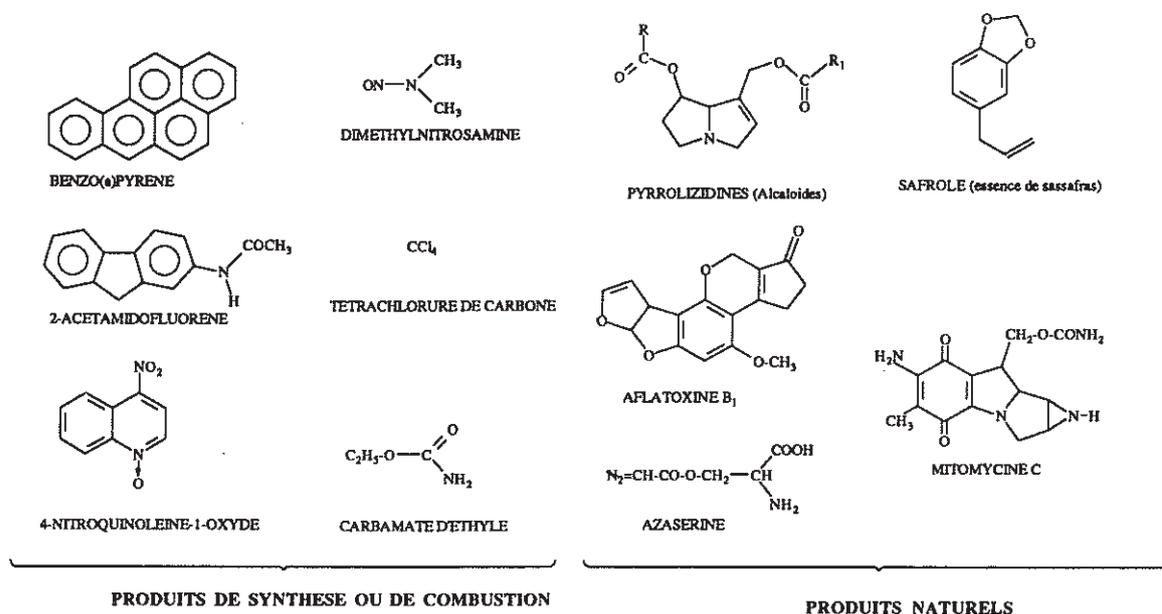


figure n°5 : Procancérogènes nécessitant une activation métabolique [3].

Mécanisme d'activation métabolique : les composés xénobiotiques hydrophobes ne peuvent être éliminés du milieu cellulaire qu'après avoir été rendus plus hydrophiles. Ceci est réalisé par une série de réactions enzymatiques dites de phase I (réactions de fonctionnalisation), puis par réactions de conjugaison à des molécules plus hydrophiles, appelées réactions de phase II.

Dans le cas de grosses molécules très hydrophobes, il est parfois nécessaire que la molécule soit fonctionnalisée plusieurs fois. Au cours de ces réactions, il peut se former des intermédiaires électrophiles qui réagissent avec divers constituants nucléophiles de la cellule (protéines, acides nucléiques, phospholipides).

S'il y a modification des acides nucléiques, cela conduit à une mutation qui peut initier un processus de cancérisation.

Exemples :

- Activation métabolique du 2-acétylaminofluorène :

Cette substance aurait dû être commercialisée comme insecticide ; la découverte de ses propriétés procancéreuses a fait rapidement oublier cette idée.

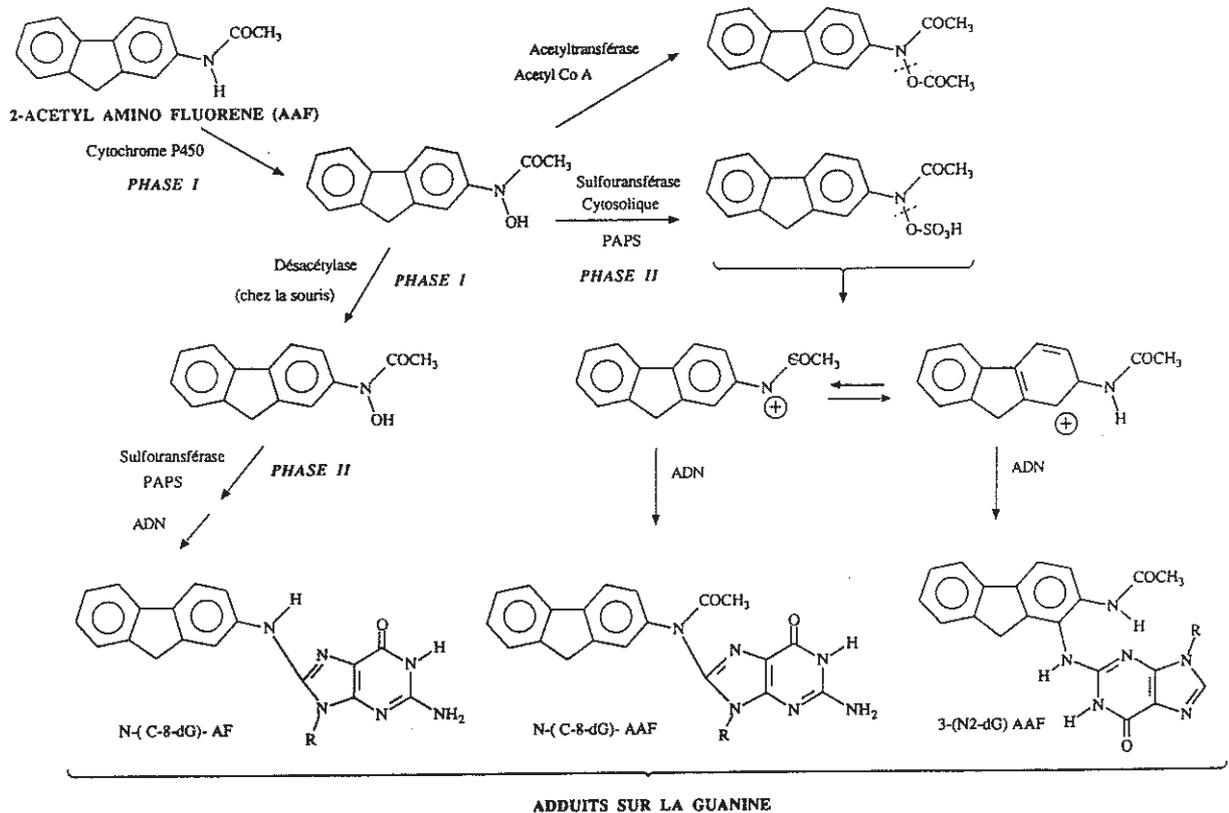


figure n°6 : Schéma de l'activation métabolique du 2-acétylaminofluorène [3].

- Activation par les enzymes de la phase II :

Pendant longtemps, les enzymes de conjugaison ont été uniquement considérées comme des systèmes de détoxication. On s'est récemment rendu compte que ces conjugués permettaient aussi le transport des toxiques vers leur cible finale.

Les glutathion-S-transférases sont capables d'activer les dérivés 1,2- et 1,3-dihalogénés en métabolites électrophiles qui peuvent réagir sur les macromolécules cellulaires.

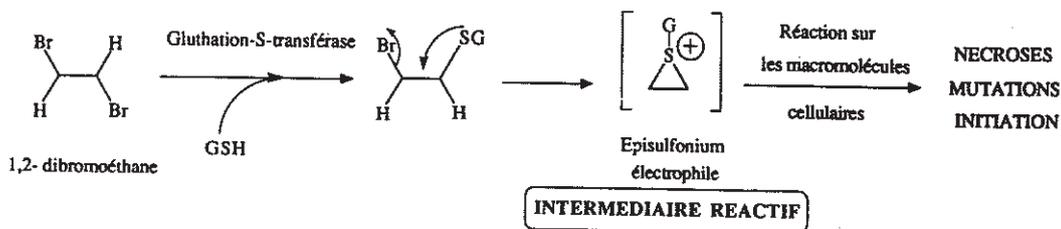


figure n°7 : Activation génotoxique des haloalkanes (selon P. Van Bladeren).

En conclusion, nous pouvons rappeler que bon nombre de substances de notre environnement quotidien présentent un potentiel cancérigène ;

- ◇ la fumée de tabac avec une phase particulière contenant des initiateurs et des agents cocancérigènes qui font du tabac un cancérigène complet ;
- ◇ la pollution atmosphérique, avec le 4-amino-diphényl, l'amiante, l'arsenic, le benzène, la suie, les goudrons,... qu'elle contient nous expose chaque jour à un risque cancérigène non négligeable.
- ◇ Il existe de nombreux arguments laissant penser que certaines caractéristiques du régime alimentaire pourraient favoriser la croissance tumorale ; cela a amené l'American Cancer Society à faire un certain nombre de recommandations :
 - éviter l'obésité ;
 - diminuer la ration lipidique ;
 - augmenter la fraction d'aliments riches en fibres (céréales, légumes) ;
 - ingérer des aliments riches en vitamines A et C ;
 - limiter les boissons alcoolisées, les aliments salés, fumés, riches en nitrites.

1.5.2.2 Carcinogènes physiques [6]

Les radiations ionisantes et les rayons U.V sont les deux sortes d'agents physiques carcinogènes.

1.5.2.2.1 Rayonnements ionisants

L'existence de cancers induits par les rayonnements ionisants est reconnue depuis longtemps. Ce sujet reste cependant d'actualité en raison du risque lié aux irradiations accidentelles et à l'incertitude de nos connaissances sur les conséquences des irradiations faibles.

Les rayonnements sont capables d'interagir avec les acides nucléiques ; cette action peut être directe ou indirecte *via* la genèse des radicaux libres oxygénés obtenus par radiolyse de l'eau.

Les lésions possibles sont des altérations des bases, la destruction du désoxyribose, les rupture simple ou double brin, les pontages intra-brin, inter-brins et ADN-protéine.

Contrairement à la plupart des agents chimiques ou des virus, les radiations ionisantes sont capables d'induire des tumeurs dans pratiquement n'importe quel tissu.

La fréquence des tumeurs est liée, de façon complexe et très variable selon la tumeur à la dose administrée et à la nature du rayonnement (rayons X, gammas, alphas ou neutrons).

Rappelons aussi que l'irradiation médicale est utilisée :

⇒ dans un **but thérapeutique** :

. le traitement de la spondylarthrite ankylosante et de la tuberculose avec du radium 224 s'accompagnent d'une augmentation de fréquence d'apparition d'ostéosarcomes ;

. par contre, l'iode 131, utilisée dans certaines formes d'hyperthyroïdies ne semble pas augmenter la fréquence de leucémies, de tumeurs thyroïdiennes.

⇒ les préoccupations actuelles sont liées aux irradiations réalisées dans un **but diagnostique** : irradiations faibles, répétées. Il ne s'agit pas de remettre en question

l'utilité des moyens radiologiques diagnostiques, mais de s'assurer, à l'échelon individuel, que le bénéfice dépasse le risque.

1.5.2.2.2 Radiations ultraviolettes

Les ultraviolets, 100 à 400 nm de longueur d'onde, sont divisés en trois groupes : les UV-A (320 à 400 nm), peu agressifs, les UV-C (200 à 290 nm) qui n'atteignent pas la surface du globe et les UV-B (290 à 320 nm) qui nous intéressent car une partie traverse l'atmosphère.

La relation entre l'exposition solaire et la fréquence des cancers cutanés est reconnue depuis plus de 100 ans : carcinomes cutanés et mélanomes malins.

1.5.2.3 Les virus

L'histoire de la cancérologie moderne est indissociable de celle de la virologie [12]. C'est avec la découverte des rétrovirus que le caractère transmissible de certaines tumeurs a été mis en évidence.

Ce n'est que beaucoup plus tard que l'on a montré que certains virus à ADN pouvaient être oncogènes [23].

1.5.2.3.1 Virus à ADN

Le génôme des virus oncogènes à ADN contient des gènes dont le produit est directement oncogène.

Chacun de ces virus est l'agent, chez l'homme, d'une maladie infectieuse non tumorale : mononucléose infectieuse (EBV), papillomes (HPV), hépatite (HBV).

L'infection aiguë s'accompagne d'une lyse cellulaire ; la période de latence entre l'infection virale et l'apparition de la tumeur est très longue.

Généralement, la transformation paraît être un événement rare parmi les cellules infectées. Les mécanismes de transformation sont encore hypothétiques.

Principaux virus oncogènes à ADN :

	VIRUS	HOTE	MALADIES NATURELLES	REMARQUES
Herpès virus	Virus de la maladie de Marek Virus de Lucké	poule grenouille (<i>Rana pipiens</i>)	Neurolymphomatose de la poule Adénocarcinome rénal de la grenouille	maladie contagieuse
	Virus d'Epstein-Barr	homme	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, cancer du nasopharynx chez l'homme	immortalise les cellules lymphoïdes B <i>in vitro</i>
	CMV	homme	Sarcome de Kaposi (?)	transforme des cellules humaines <i>in vitro</i>
Adénovirus	37 types classés en 5 groupes 24 types chez le singe	homme singe	Néant ?	Oncogène pour le hamster transforme les cellules de rat et de souris
Papillomavirus	Papillomavirus humain	homme	Tumeurs bénignes (verrues, condylomes) Rôle étiologique de certains types dans le cancer du col de l'utérus.	
	Papillomavirus bovins	bovins	Verrues, cancer du tube digestif et de la vessie.	
	Papillome de Shope	lapin	Papillome de Shope.	Oncogène pour le hamster
Polyomavirus	SV40	singe	Néant	
	polyome	souris	Tumeurs multiples chez le souris	Transformation de fibroblastes de nombreuses espèces
	polyomavirus humain BKV JCV	homme	Néant	
Hépatovirus	Hépatite B WHBV G SHV D HBV	homme marmote écureuil canard	Carcinome hépatique " Hépatite " "	

figure n°8 : Principaux virus oncogènes à ADN [3].

1.5.2.3.2 Virus à ARN

Une famille de virus à ARN intéresse particulièrement le cancérologue ; il s'agit de la famille des rétrovirus, ainsi appelés du fait de leur capacité de se répliquer en ADN grâce à une enzyme codée par le virus, transcriptase inverse.

Les rétrovirus ont ainsi la capacité de se transformer en ADN et de s'intégrer au noyau cellulaire.

Parmi les virus à ADN induisant des cancers, nous citerons :

- Le MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus), suspecté d'intervenir dans les cancers du sein ; chez les femmes atteintes de cancers du sein, on a relevé une protéine proche d'une de celles synthétisées par le MMTV.
- Le HTLV (Human T Leukemia Virus) est associé à certaines leucémies de mauvais pronostic.
- Le VIH : les affections tumorales (sarcome de Kaposi, lymphomes non hodgkiniens) liées au virus du SIDA sont une des conséquences de l'immunodéficience acquise.

DEUXIEME PARTIE

2. DEUXIEME PARTIE : LES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX

2.1 LE CYCLE CELLULAIRE [2,14]

La cible ultime des agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse est toujours un constituant cellulaire : ADN, ARN, protéines, enzymes,...

La relation entre le principe actif et sa cible va tendre à imposer à la cellule une contrainte d'inhibition de croissance.

Le niveau et le type d'activité cellulaire varient selon le moment de la vie cellulaire pendant lequel va s'établir cette relation.

La connaissance du cycle cellulaire apparaît donc fondamentale, du moins sur le plan de la stratégie théorique en oncologie.

Le cycle cellulaire (**figure n°9**) débute, arbitrairement, par la **mitose**. Celle-ci, aboutissant à la division d'une cellule mère en deux cellules filles, comporte quatre étapes : la prophase avec division des chromosomes en chromatides et formation du système fusorial, la métaphase avec disposition des chromosomes sur la plaque équatoriale, l'anaphase avec séparation du matériel génétique en double exemplaire et la télophase avec élaboration des membranes nucléaires et division cytoplasmique.

La seconde étape du cycle est la **phase G1** ou **post-mitotique**. Elle correspond au moment où la machinerie cellulaire va s'orienter vers la synthèse des ARN et des protéines qui vont être nécessaires à la duplication de l'ADN. Durant cette période, le niveau d'activité de la cellule est extrêmement variable selon le type cellulaire et les conditions écologiques. Tantôt très élevé en cas de renouvellement cellulaire rapide, tantôt très lent, la cellule apparaissant quiescente (phase G0) ou enfin orientée plutôt vers un affinement qualitatif correspondant à la différenciation cellulaire.

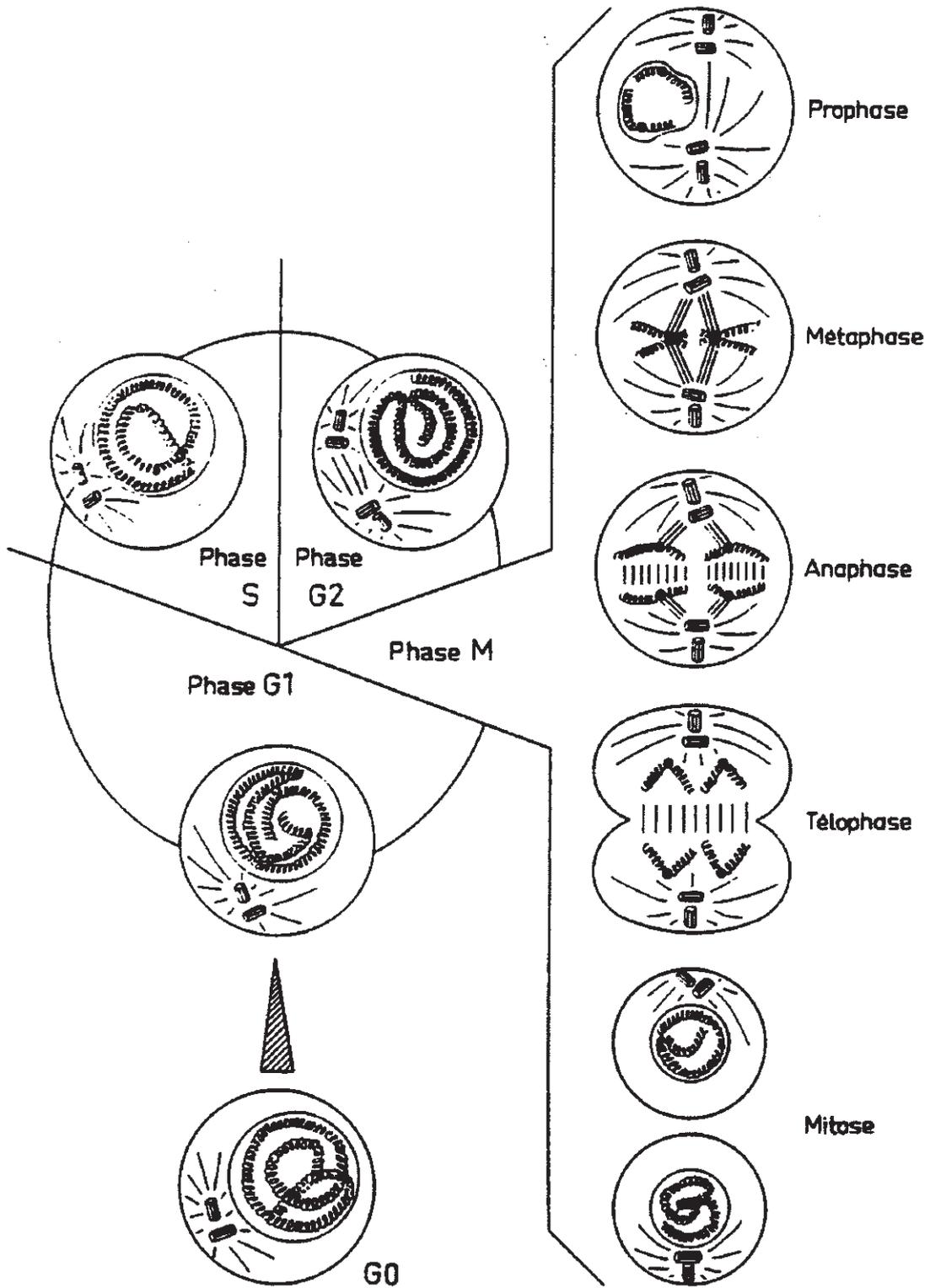


Figure n°9 : Le cycle cellulaire.

La troisième étape, **phase S**, commence avec la duplication de l'ADN (synthèse de la copie d'ADN) grâce à laquelle les deux cellules filles hériteront du même matériel génétique que la cellule mère. La fin de la phase S est donc marquée par la présence d'une double quantité d'ADN au sein de la cellule.

L'étape suivante, **phase G2** ou **prémitotique**, présente une durée relativement fixe (contrairement à la phase G1) quelles que soient les cellules. Elle correspond au début de la synthèse des constituants essentiels à la mitose et notamment du fuseau mitotique.

2.2 LES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX

2.2.1 Médicaments anticancéreux et cycle cellulaire [8, 19]

Ainsi définies les différentes étapes du cycle cellulaire, les drogues anticancéreuses peuvent être présentées selon qu'elles agissent :

- exclusivement sur des cellules en division : **substances cycle dépendantes** ;
exemple : Fluoro-5 Uracile, agents alkylants, Bléomycine ;
- spécifiquement sur une seule phase du cycle cellulaire : **substances phase dépendantes** ;
exemple : agents intercalants, antimitotiques fusoriaux ;
- indifféremment sur toutes les cellules du cycle cellulaire qu'elles soient en division ou en phase de repos (G0) : **substances cycle indépendantes**.
exemple : hormones et antihormones employées dans le traitement des cancers hormonodépendants.

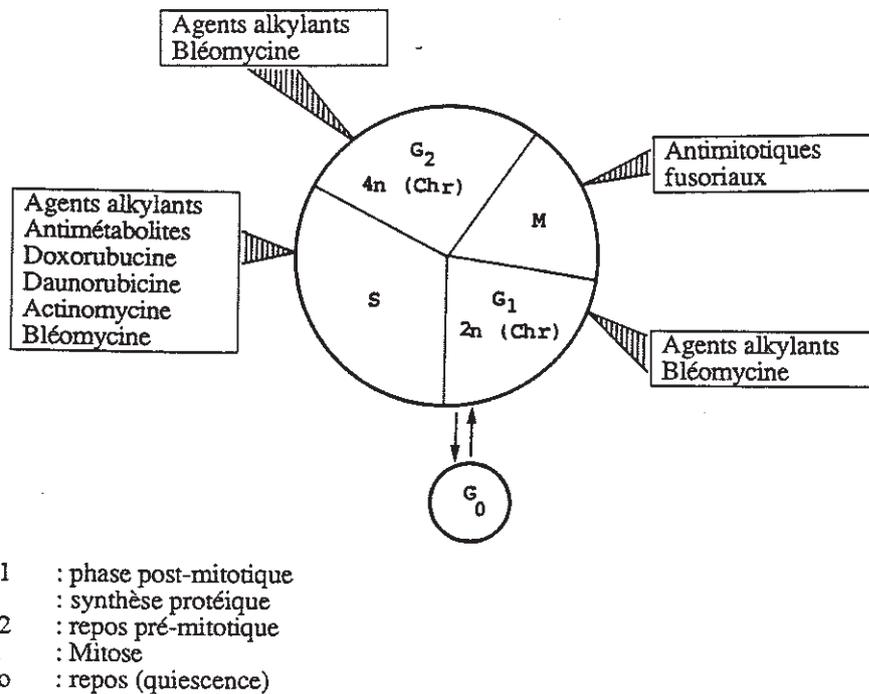


figure n°10 : Action des anticancéreux au niveau du cycle cellulaire [19].

2.2.2 Mécanisme d'action des anticancéreux [10]

L'action biochimique des anticancéreux peut s'effectuer à trois niveaux différents et ils peuvent être classés en fonction de leur site d'action :

- Les **antimétabolites** : ce sont des inhibiteurs de la synthèse des nucléotides et des désoxynucléotides ;
- les **agents agissant sur la structure de l'ADN** en diminuant la réplication de celui-ci, ou en empêchant sa transcription en ARN ;
- les **agents agissant sur des fonctions cellulaires** (enzymes, cytosquelette).

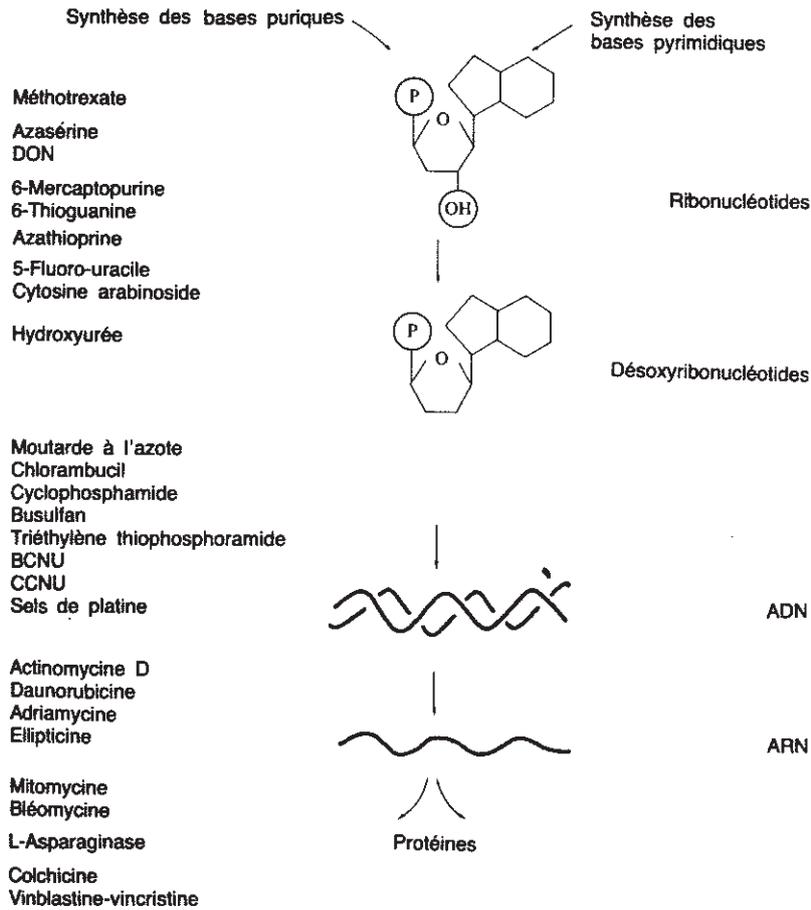


figure n°11 : Mécanisme d'action des substances anticancéreuses [8].

2.2.2.1 Les antimétabolites

Ce sont des médicaments ayant une structure analogue à celle des métabolites et des coenzymes, intervenant au cours des biosynthèses des acides nucléiques et des protéines, par inhibition compétitive.

Il existe trois grands groupes d'antagonistes : les analogues des **bases puriques**, des **bases pyrimidiques** et de **l'acide folique** (figure n°12).

2.2.2.1.1 Antimétabolites des bases puriques

- La 6-mercaptopurine = PURINETHOL* est un antimétabolite de l'adénine et de l'hypoxanthine par formation d'un analogue de l'acide inosinique (acide thioinosinique)

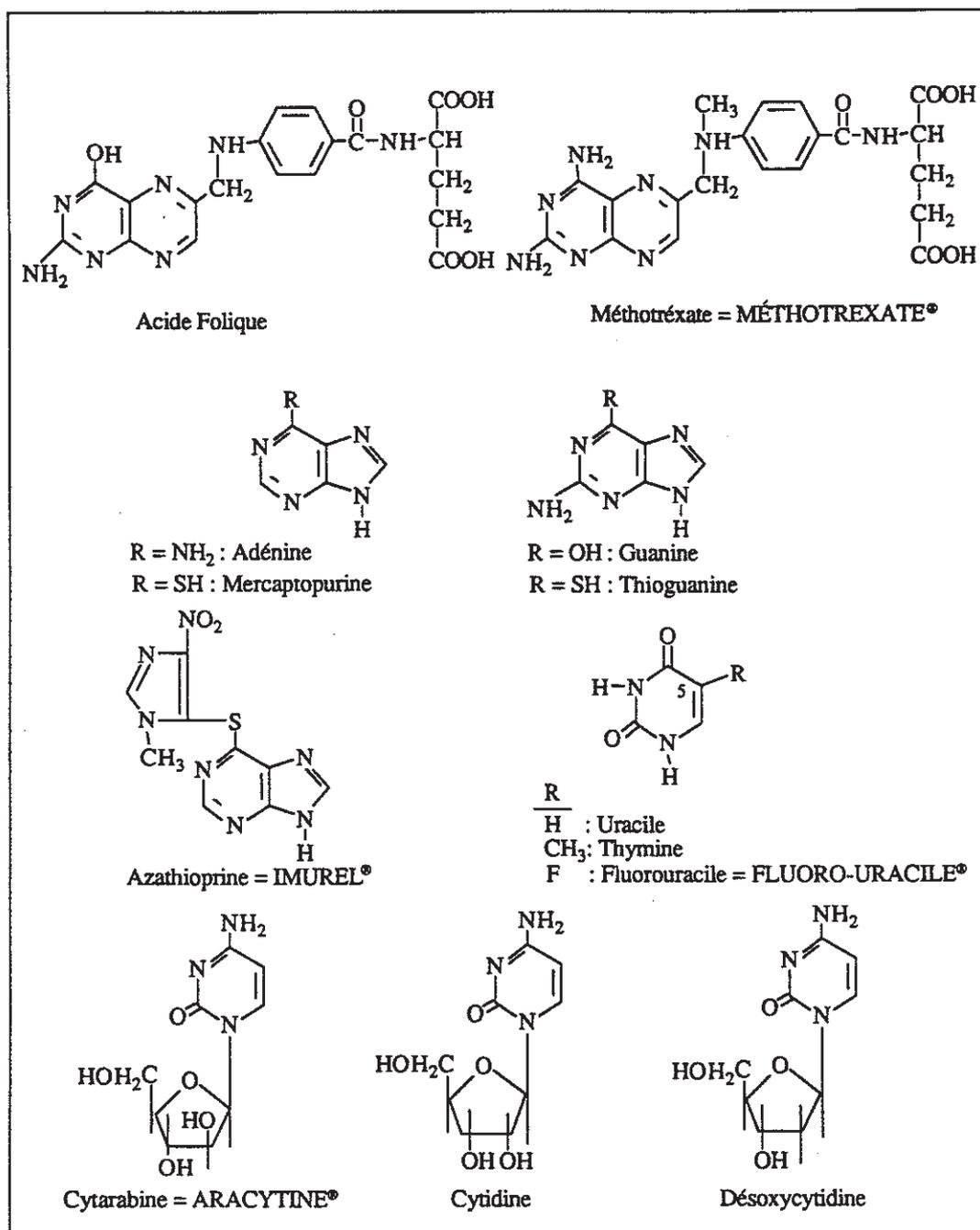


figure n°12 : Les antimétabolites [19].



empêchant la biosynthèse des purines.

- La 6-thioguanine = LANVIS* est un analogue structural de la guanine, ayant une action inhibitrice de la biosynthèse des bases puriques.

- L'azathioprine = IMUREL* est un dérivé de la 6-mercaptopurine ; cet antimétabolite des purines est un immunodépresseur puissant et est aussi de ce fait très souvent indiqué dans les greffes d'organes.

2.2.2.1.2 Analogues des bases pyrimidiques

- Le 5-fluoro uracile = FLUORO URACILE* agit après biotransformation en 5-fluoro désoxyuridine monophosphate (F-dUMP) ; celui-ci inhibe la thymidilate synthétase qui transforme la désoxyuridine monophosphate (dUMP) en thymidine monophosphate (dTMP)

- La cytarabine : ARACYTINE* (cytosine arabinose)

Le désoxyribose entrant dans la constitution du nucléotide normal est remplacé par l'arabinose, ce qui rend l'ADN non fonctionnel. Par ailleurs, cette substance possède une action inhibitrice de l'ADN polymérase.

2.2.2.1.3 Analogues de l'acide folique

L'acide folique est indispensable à la synthèse des bases azotées et des acides nucléiques; il est fourni à la cellule par l'apport alimentaire ou synthétisé.

Il est ensuite converti au cours d'une série de transformations en un coenzyme : le tétrahydrofolate (THF) qui assure le transfert de radicaux monocarbonés dans plusieurs réactions biochimiques, notamment dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

Sa régénération par la THF réductase est une étape clef dans la biosynthèse des nucléotides.

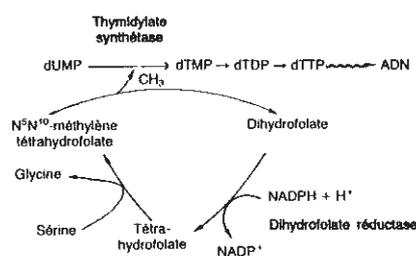


figure n°13 : Intervention de la DHF réductase dans la synthèse des bases azotées [8].

- Le méthotrexate = METHOTREXATE* (analogue de l'acide folique) est un puissant inhibiteur de la dihydrofolate réductase, empêchant la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate.

Le méthotrexate agit exclusivement sur les cellules en phase S (synthèse de l'ADN) et épargne toutes les autres cellules notamment les cellules en phase G0.

2.2.2.2 Substances agissant sur la structure de l'ADN

Trois grands groupes de substances sont susceptibles de modifier la structure de l'ADN: les alkylants, les scindants, les intercalants.

2.2.2.2.1 Les alkylants

Les alkylants (**figures n°14 et n°15**) sont des substances électrophiles, ou capables de donner naissance à des substances électrophiles *in vivo*, avides de se combiner avec d'autres molécules au niveau de régions riches en électrons.

La fixation de ces molécules sur l'ADN se ferait essentiellement grâce aux doublets d'électrons portés par les atomes d'azote des bases puriques et pyrimidiques (surtout de la guanine), mais aussi au niveau des groupements phosphates.

Les ponts inter et intrabrin ainsi formés provoqueraient des cassures ou dégradations au sein de la macromolécule d'ADN, inhibant sa réplication, sa transcription en ARN et induisant une mort cellulaire.

Les principaux agents alkylants sont :

- Les **amines chlorées** qui agissent par la formation d'ions éthylèniminium (aziridinium) très réactifs, qui donnent lieu à la formation de ponts stables entre les deux chaînes de l'ADN par liaison covalente.

Ces ponts se forment essentiellement au niveau de l'azote de la guanine des chaînes d'ADN, bloquant ainsi la duplication.

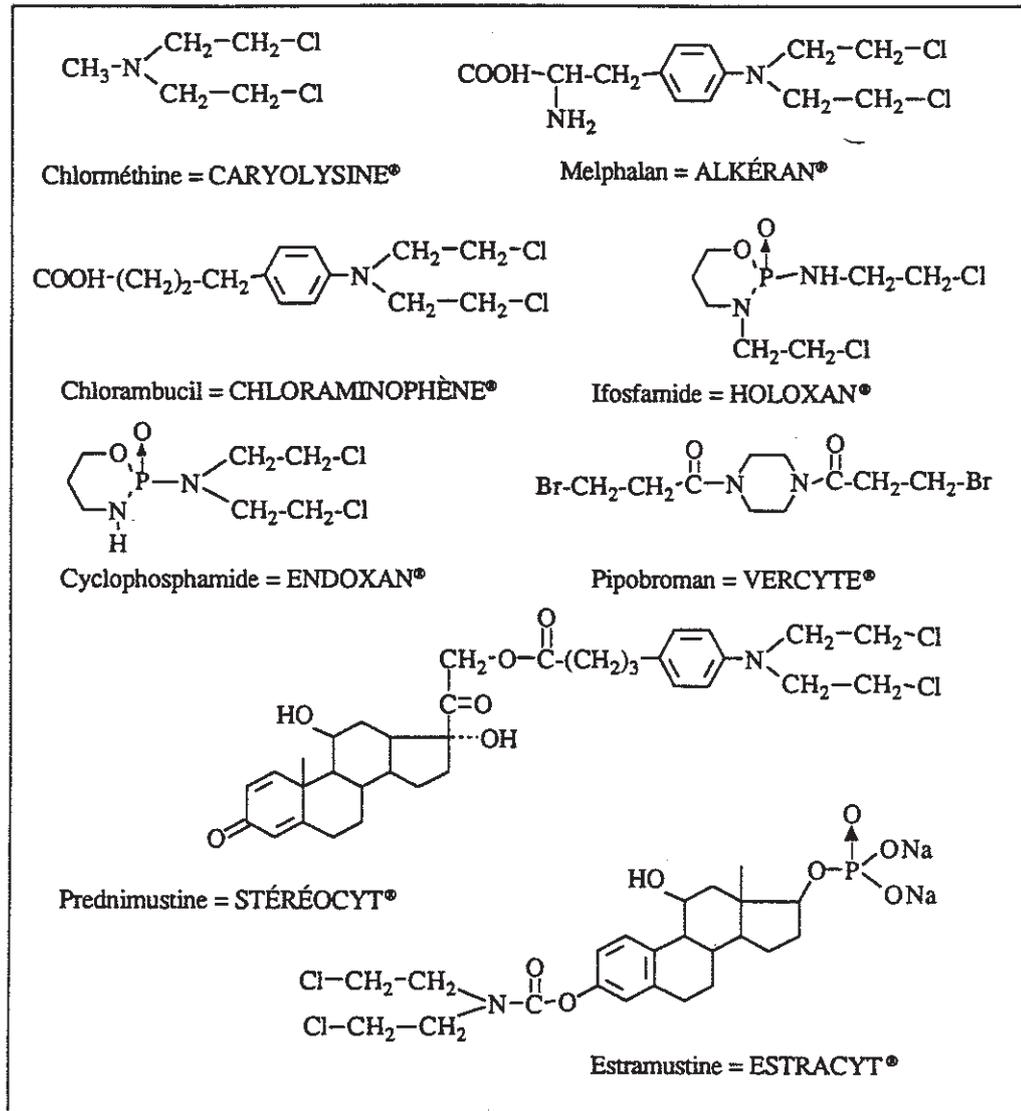


figure n°14 : Agents alkylants : les amines chlorées [19].

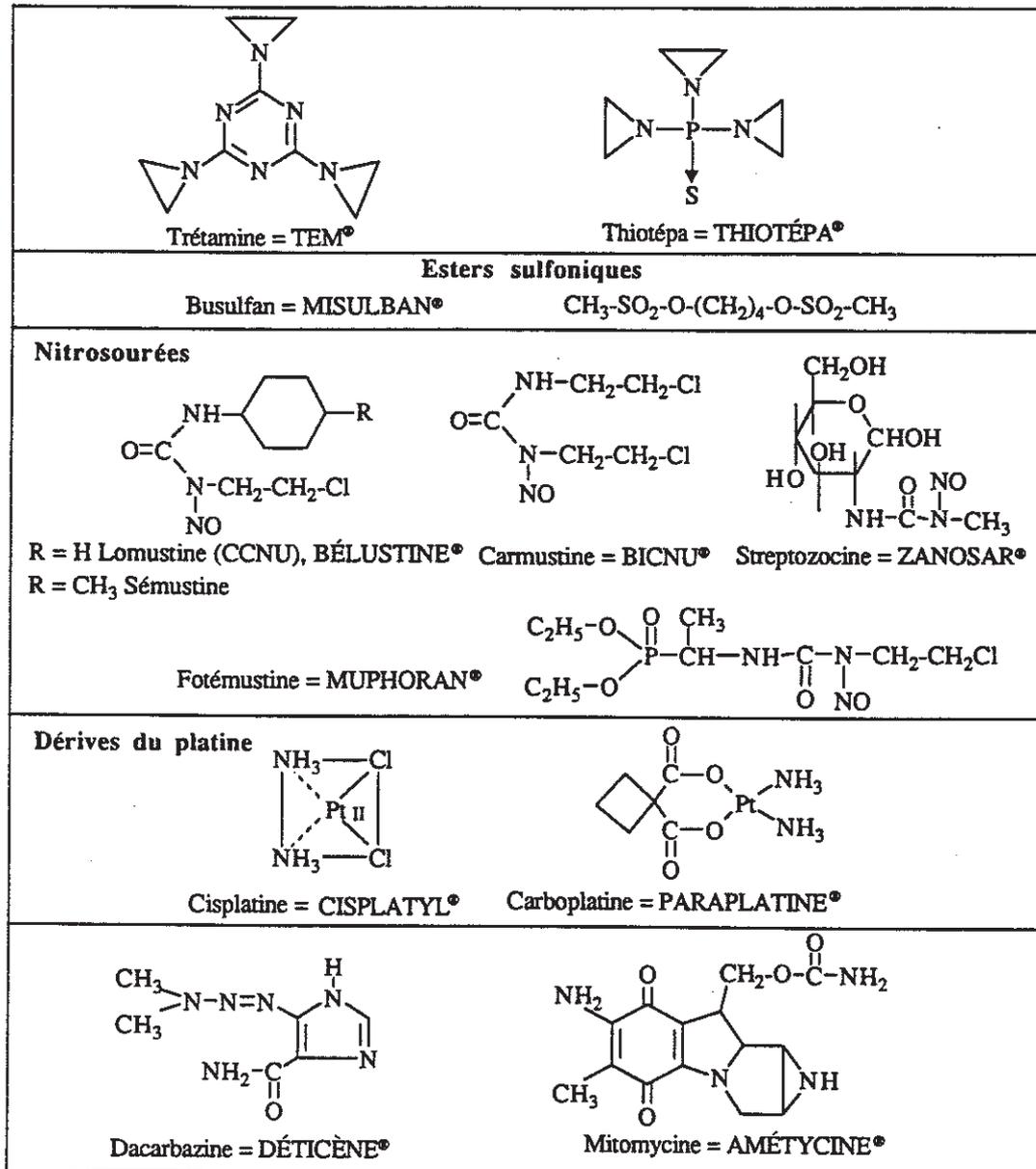


figure n°15 : Les autres agents alkylants [20].

- Les **éthylènimines** : ces molécules comportent des substituants éthylènimines qui se transforment dans l'organisme en ions éthylèniminium, qui agissent par un mécanisme identiques aux amines chlorées.

- Les **esters sulfoniques** : une seule substance est utilisée en chimiothérapie anticancéreuse : le busulfan = MISULFAN*

C'est un agent alkylant voisin des précédents ; son activité pharmacologique est originale en ce sens qu'elle ne s'exerce que sur une seule cible : la moëlle osseuse.

- Les **nitroso-urées** sont des médicaments qui se décomposent rapidement dans l'organisme en isocyanate et en ion carbonium.

L'ion carbonium est un alkylant monofonctionnel capable de réagir avec l'ADN, mettant ainsi en jeu les mécanismes cellulaires de sa réparation.

Les dérivés isocyanates réagissent avec les protéines et sont capables d'inhiber les enzymes de réparation de l'ADN.

La complémentarité de ces deux effets pourrait expliquer la production de lésions irréversibles de l'ADN conduisant à la mort cellulaire.

2.2.2.2.2 Les scindants

Le principal agent scindant est la bléomycine = BLEOMYCINE* ; c'est un glycopeptide constitué principalement par un mélange de deux substances, bléomycine A2 et bléomycine B2, toutes deux extraites de *Streptomyces verticillus*.

Cet anticancéreux provoque la cassure des chaînes d'ADN, s'oppose à l'incorporation de la thymidine à l'ADN et inhibe les ADN polymérase.

Il est phase dépendant et agit spécifiquement en phase G2.

2.2.2.2.3 Les intercalants (figure n°16)

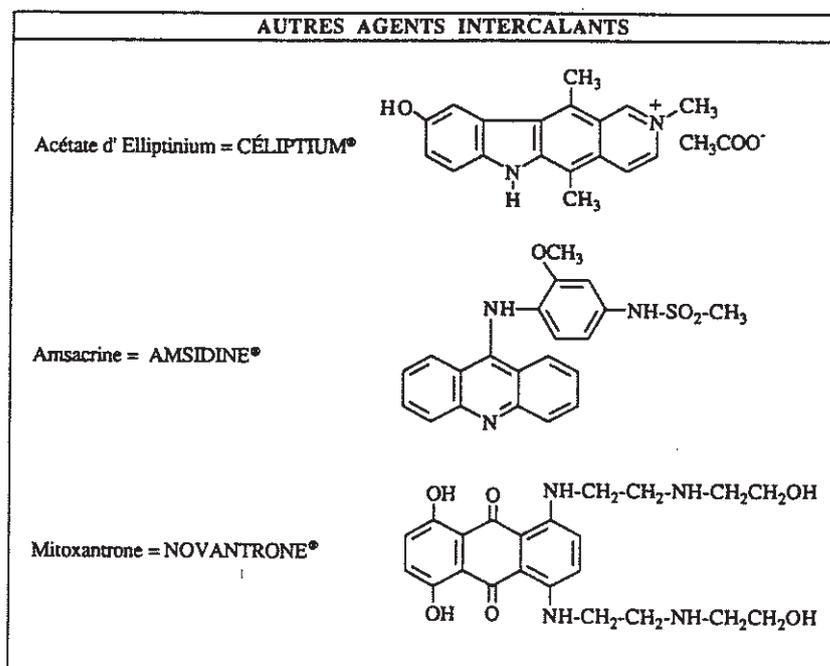
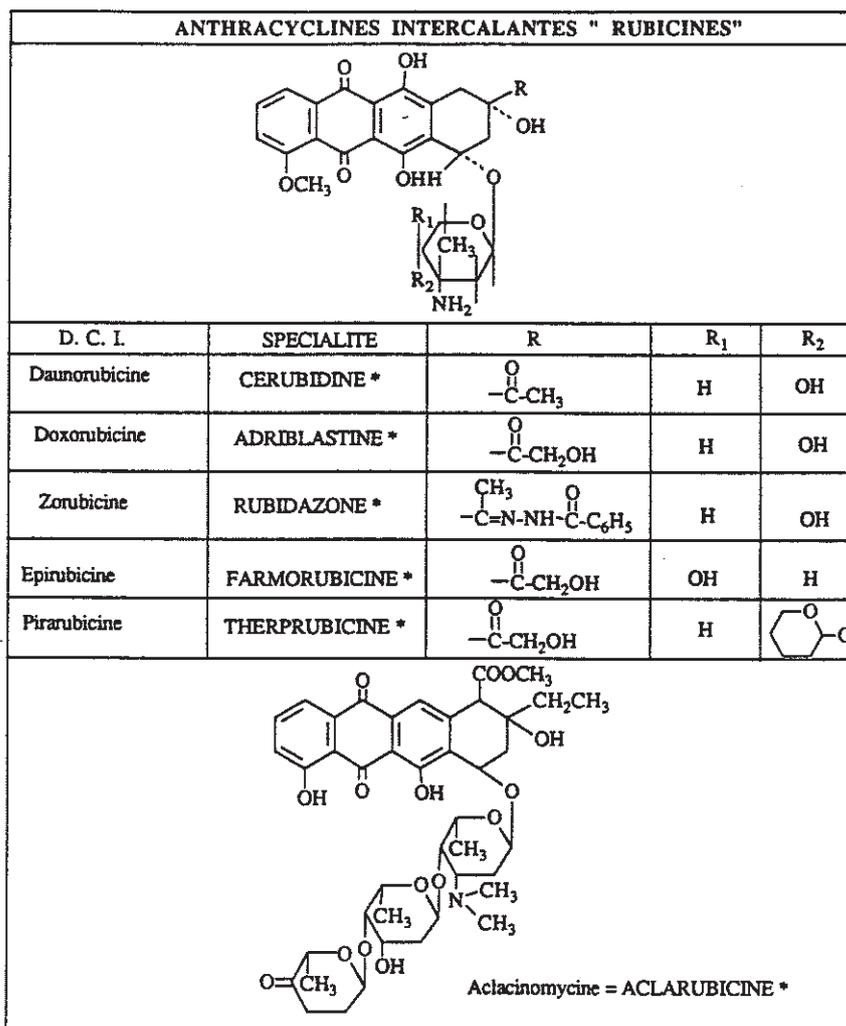


figure n°16 : Les intercalants [19].

En dépit de l'hétérogénéité biochimique et de la diversité d'origine de ses constituants, ce groupe de substances possède une action cytotoxique commune ; en effet, les agents intercalants sont des médicaments dont la structure et la conformation leur permettent de se loger ("s'intercaler") parallèlement aux plateaux de paires de bases de l'ADN (adénine-thymine et guanine-cytosine).

Par suite de la formation de liaisons covalentes stables avec l'ADN, ils inhibent la réplication et la transcription.

La plupart agissent sur la phase S du cycle cellulaire (duplication de l'ADN).

- Les **antibiotiques** : ils appartiennent à la famille des anthracyclines "intercalantes", qui étaient à l'origine extraites de plusieurs variétés de *Streptomyces* ; les nouveaux dérivés sont eux obtenus par synthèse ou hémisynthèse.

- **D'autres agents intercalants** synthétiques méritent d'être cités :

. l'elliptinium (acétate) = CELIPTIUM* est un dérivé obtenu par hémisynthèse à partir de l'ellipticine (alcaloïde isolé d'une plante tropicale) ; c'est un inhibiteur de la synthèse de l'ADN, de l'ARN, et des protéines ;

. l'amsacrine = AMSIDINE* ;

. la mitoxantrone = NOVANTRONE* est un dérivé de l'anthraquinone substituée par des groupements amino-alcools. cette substance inhibe la synthèse de l'ADN et provoque des cassures de celui-ci.

2.2.2.3 Composés agissant sur des fonctions cellulaires

2.2.2.3.1 Inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline

Les anticancéreux agissant à ce niveau sont aussi appelés **antimitotiques vrais** ou **poisons du fuseau**.

La tubuline est une protéine dimère constituée de deux sous-unités α et β ; elle est présente dans le cytoplasme de la cellule et, en se polymérisant, forme les microtubules.

Outre leur rôle dans les phénomènes de phagocytose, mouvements, transports cellulaires, ces microtubules constituent les centrioles, le fuseau mitotique et participent donc à la division cellulaire.

Un certain nombre de substances inhibitrices de la polymérisation de la tubuline sont utilisées en chimiothérapie anticancéreuse (**figure n°17**).

Certains de ces agents sont des alcaloïdes extraits de *Vinca rosea* (pervenue rose) : vincristine, vinblastine, vindésine ; un dérivé de ces alcaloïdes est maintenant utilisé en thérapeutique anticancéreuse : la vinorelbine.

D'autres sont des dérivés hémisynthétiques de la podophyllotoxine, substance extraite de résine de *Podophyllum peltatum* (Amérique) ou *Podophyllum emodi* (Inde) : la téniposide et l'étoposide.

Leur mécanisme d'action n'a pas été clairement établi ; il semblerait que ces substances induiraient des cassures de l'ADN par la topoisomérase II (qui catalyse le clivage des deux brins d'ADN), qu'elles agiraient par blocage des cellules à l'interphase S-G2.

2.2.2.3.2 L-asparaginase = KIDROLASE*

La L-asparaginase est une enzyme extraite de cultures de colibacilles (*Escherichia coli*). Sous l'influence de la L-asparaginase, l'asparagine, acide aminé indispensable à la croissance cellulaire, est hydrolysé en acide aspartique et ammoniacque (**figure n°18**).

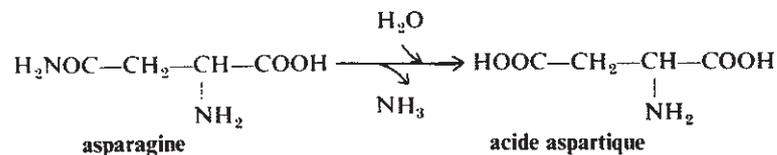


figure n°18 : Réaction de désamidation de l'asparagine [15].

L'asparagine est synthétisée par les tissus normaux, mais non par les cellules tumorales, qui sont dépourvues d'asparagine synthétase.

Il en résulte une inhibition de la croissance cellulaire.

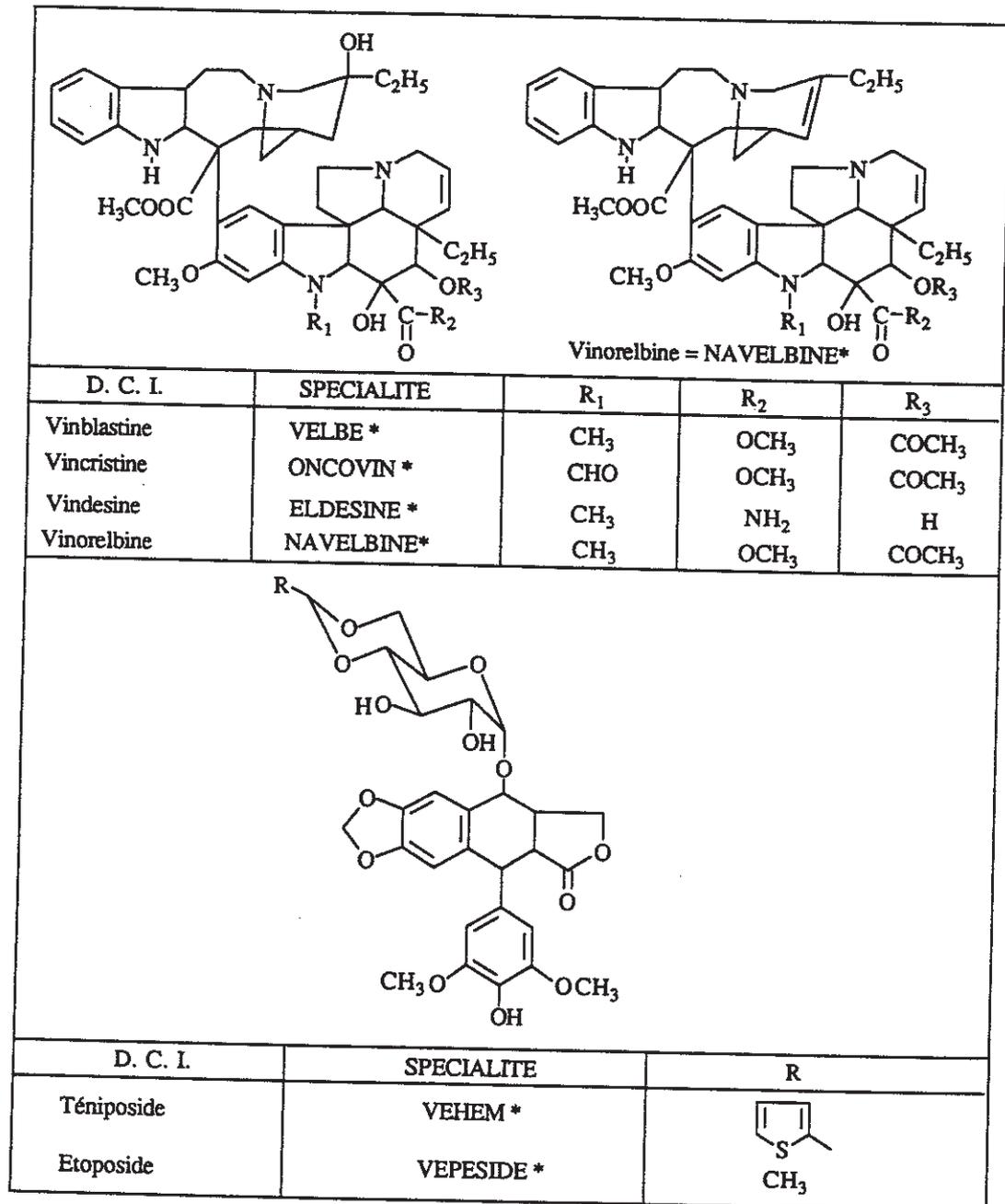


figure n°17 : Inhibiteurs de la mitose [19].

2.2.2.4 Hormones et antihormones

Ces substances sont spécialement employées dans le traitement des cancers hormonodépendants, c'est à dire les carcinomes de la prostate, du sein et de l'endomètre (figures n°19 et 20).

2.2.2.4.1 Hormones

Les molécules agissent en mettant en jeu des interactions avec les récepteurs membranaires spécifiques qui déclenchent la mitose et la prolifération des cellules porteuses de ces récepteurs.

Ces récepteurs protéiques se trouvent dans le cytoplasme des tissus hormonodépendants, et leur détermination est nécessaire à l'orientation thérapeutique hormonale.

- Les androgènes

Ils sont de moins en moins utilisés dans le traitement du cancer mammaire en raison de la virilisation qu'ils entraînent.

- Les estrogènes

L'utilisation des estrogènes dans le traitement du cancer prostatique a pour objectif d'exercer une action anti-androgénique par blocage de la production hypophysaire de LH.

De nos jours, les estrogènes de synthèse ne sont plus beaucoup indiqués dans ce type d'affections ; en effet, l'action des estrogènes dans le traitement des tumeurs présente des limites: 30% des cas résistent au traitement.

- Les progestatifs

Certains progestatifs de synthèse employés à fortes doses sont actifs :

. dans le traitement du cancer du sein et de l'endomètre : noréthistérone = NORLUTEN*;

. dans le traitement du cancer de la prostate : cyprotérone = ANDROCUR*.

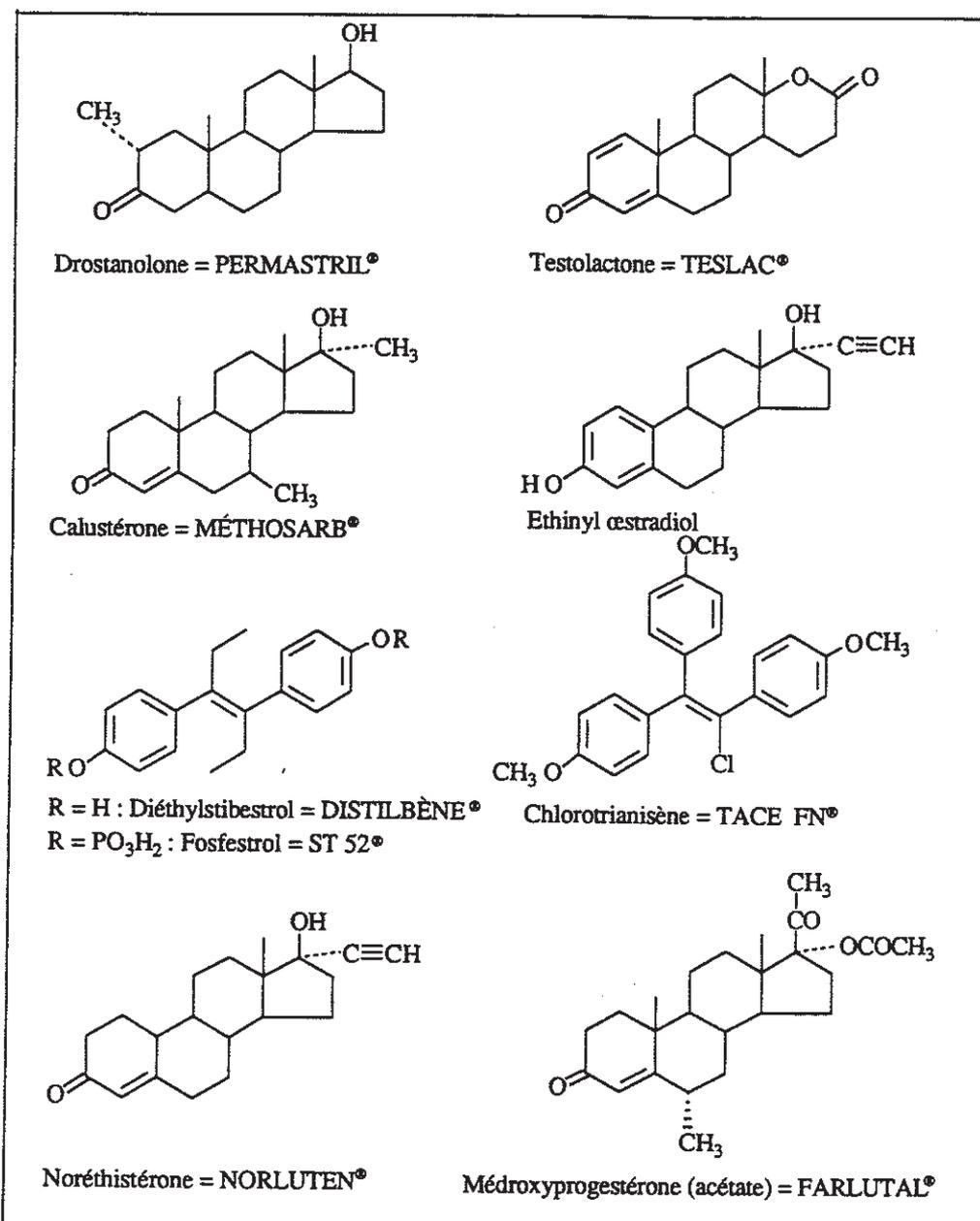


figure n°19 : Hormones et antihormones [19].

2.2.2.4.2 Les antihormones

Les antihormones, antiestrogènes et antiandrogènes, sont des classes de molécules synthétiques relativement nouvelles.

- Les antiestrogènes :

Tamoxifène = NOLVADEX*

Rappelons que les estrogènes constituent un des facteurs promoteurs, favorisant chez la femme le développement des tumeurs (cancer du sein).

Or, un antiestrogène tel que le tamoxifène se lie aux récepteurs de l'estradiol, et bloque ainsi l'action des estrogènes.

- Les antiandrogènes

Ces antagonistes sont des molécules qui se fixent sur les récepteurs des androgènes et inhibent leur action de façon compétitive.

La flutamide = EULEXINE* et la nilutamide = ANANDRON* sont actuellement très utilisées en chimiothérapie anticancéreuse ambulatoire dans le traitement du cancer de la prostate.

- Dans ce paragraphe sur les antihormones, citons l'aminoglutéthimide = ORIMETENE* qui est un inhibiteur de la biosynthèse des corticoïdes au niveau des surrénales; il agit par blocage dans la tumeur et à la périphérie, de la transformation des androgènes en estrogènes (inhibition de l'aromatase).

2.2.2.4.3 Les analogues de la LH-RH

La LH-RH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) est une substance polypeptidique élaborée dans l'hypothalamus, gagnant le lobe antérieur de l'hypophyse par la tige pituitaire et contrôlant la sécrétion par l'antéhypophyse des gonadostimulines FSH et LH.

L'action agoniste de la LH-RH naturelle, entraîne une stimulation initiale de la sécrétion des hormones gonadotropes, puis une inhibition de cette sécrétion aboutissant à un hypogonadisme.

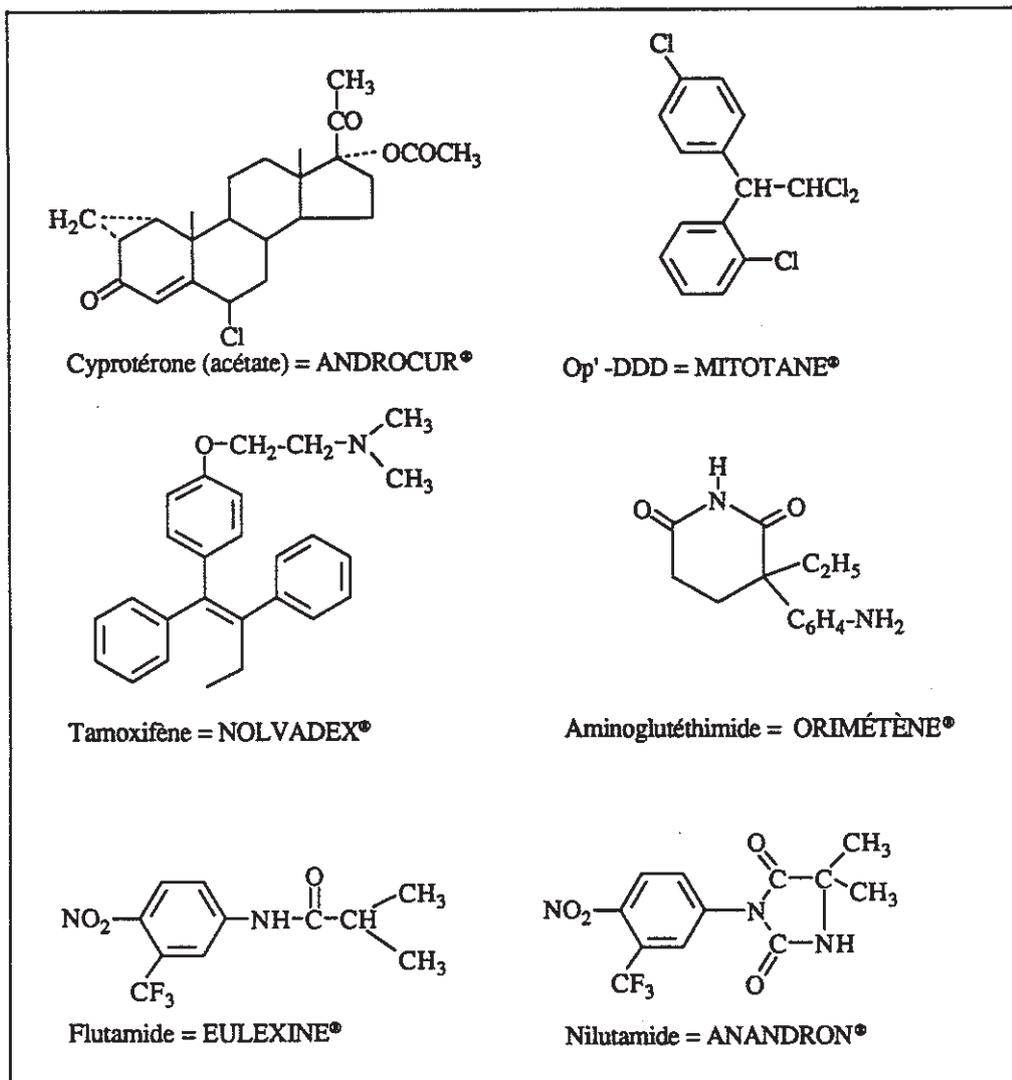


figure n°20 : Hormones et antihormones (suite) [19].

Les dérivés actuellement utilisés en thérapeutique correspondent à la structure modifiée de la LH-RH au niveau de la glycine et son remplacement par d'autres aminoacides, lui conférant une stabilité supérieure :

- . triptoréline = DECAPEPTYL*
- . buséréline = SUPREFACT*
- . goséréline = ZOLADEX*
- . leuprolide = LUCRIN*

2.2.2.5 Autres dérivés utilisés en chimiothérapie anticancéreuse

D'autres substances sont utilisées pour leur activité anticancéreuse et n'appartiennent à aucune des classes citées ci-dessus :

- cisplatine = CISPLATYL* et son dérivé carboplatine = PARAPLATINE* ; ces composés sont des complexes du platine. Leur mécanisme d'action est voisin de celui des agents alkylants par fixation sur l'ADN, formation de ponts inter et intra-brins, inhibant la synthèse de l'ADN.

- hydroxyurée = HYDREA*

Ce composé est un inhibiteur de la ribonucléoside diphosphatase réductase. Cette enzyme catalyse une étape de la synthèse de l'ADN, la réduction du ribose en désoxyribose.

- procarbazine = NATULAN*

Cette substance n'est pas active par elle-même, elle doit subir plusieurs oxydations successives. Le mécanisme d'action n'est pas clairement établi, mais il semble que l'action cytotoxique résulte d'une méthylation de l'ADN et de la formation de radicaux libres. Les résultats de l'action de la procarbazine sont des coupures d'ADN et des translocations.

- hexaméthylmelamine = HEXASTAT*

Le mécanisme est complexe ; ce composé de structure proche des éthylènimines semble agir à la fois comme un alkylant et comme un antimétabolite des pyrimidines.

TROISIEME PARTIE

3. Troisième partie : Mise en évidence de complexes par transfert de charge entre ADN et intercalants ADN

3.1 INTRODUCTION

Les anticancéreux sont des médicaments capables de stopper le développement d'une population cellulaire définie.

Comme nous l'avons vu précédemment, certaines molécules ont une action sur la structure même de l'ADN, d'autres agissent en inhibant la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines.

Parmi les anticancéreux, nous avons détaillé les intercalants ADN qui, au cours de la réplication de l'ADN s'intègrent entre deux paires de bases puriques et pyrimidiques.

Or, cette intercalation ne peut se produire que *in vivo* puisqu'elle se déroule pendant la phase S du cycle cellulaire (réplication de l'ADN) ; il faut donc qu'il y ait obligatoirement multiplication cellulaire.

D'autre part, en étudiant la structure chimique des intercalants ADN, nous avons pensé qu'une liaison ionique ou semi ionique ADN - intercalant ADN pouvait se former c'est-à-dire qu'un "complexe" pouvait apparaître.

En établissant un parallélisme avec les complexes iodés par transfert de charge, nous avons pensé qu'il serait possible de réaliser une étude spectrophotométrique de la formation de ces éventuels complexes.

3.2 METHODOLOGIE

Les complexes susceptibles de se former et le type de liaisons en cause entre l'ADN et les molécules étudiées, dépendent d'une part de l'ADN, sa structure et ses propriétés physiques, d'autre part des propriétés structurales et mésomériques des molécules étudiées.

Pour la mise en place du protocole expérimental, une étude précise de l'ADN est nécessaire ; le choix de la méthode de détection des éventuels complexes ADN-intercalant ADN a été au départ basé sur une hypothèse d'établissement de liaison ionique.

3.2.1 Etude de l'ADN

3.2.1.1 Définition :

L'ADN, acide désoxyribonucléique, est le plus important des constituants chimiques des chromosomes.

Il détermine l'ensemble des synthèses opérées par la cellule.

Les molécules d'ADN sont les plus grosses molécules du monde vivant : leur masse moléculaire varie de plusieurs millions à plusieurs milliards ; cependant, elles ont toutes la même structure.

3.2.1.2 Structure :

La molécule d'ADN a la forme de deux hélices enroulées l'une autour de l'autre (Modèle de WATSON et CRICK 1953).

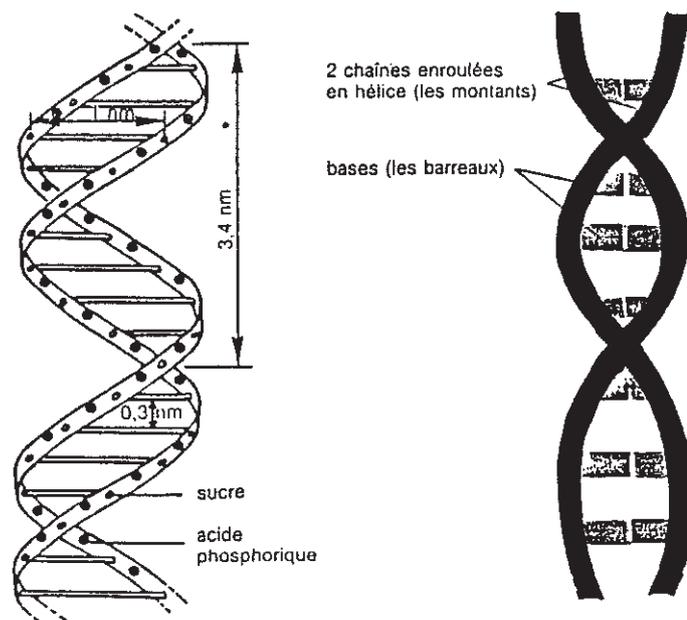


figure n°21 : Représentations schématiques d'une portion de la molécule d'ADN.

Chaque chaîne est un polymère de nucléotides constitué par :

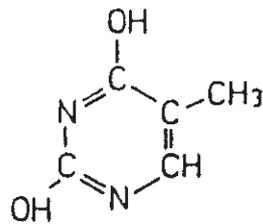


P : Acide phosphorique = H_3PO_4

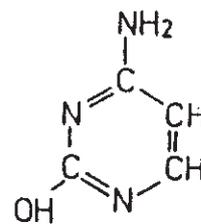
S : Sucre en C_5 = Désoxyribose

A : Bases organiques azotées

** Bases puriques :*

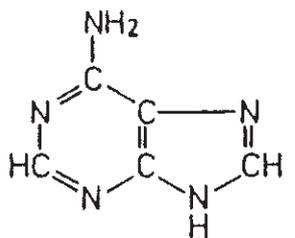


THYMINE

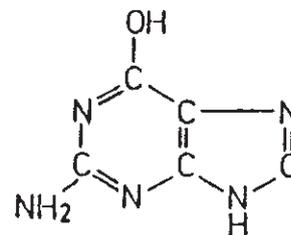


CYTOSINE

** Bases pyrimidiques :*



ADENINE



GUANINE

Selon la nature de la base, il existe donc quatre sortes de nucléotides.

Dans la chaîne de nucléotides, des liaisons covalentes réunissent l'acide phosphorique

d'un nucléotide et le désoxyribose du nucléotide suivant.

Les deux chaînes de la molécule d'ADN sont reliées entre elles par des liaisons transversales plus fragiles, liaisons hydrogènes, établies entre les bases des deux nucléotides placés face à face.

Les bases organiques azotées sont complémentaires deux à deux :

- ◆ l'adénine ne peut se lier qu'avec la thymine.
- ◆ la guanine ne peut se lier qu'avec la cytosine.

On a donc le schéma suivant :

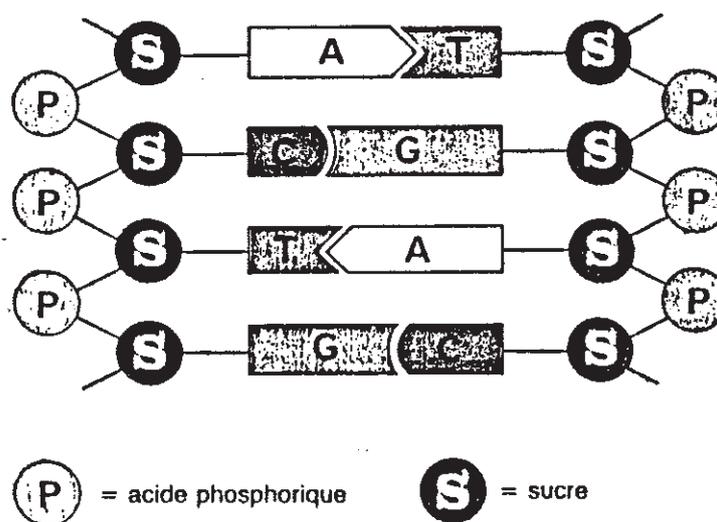


figure n°22 : Représentation schématique en plan (hélice déroulée) de la molécule d'ADN.

3.2.1.3 La répllication de l'ADN :

Toutes les cellules d'un organisme possèdent la même qualité et la même quantité d'ADN.

In vivo, la réplication de l'ADN se fait selon un modèle semi-conservatif par :

- écartement des deux chaînes ;
- synthèse de deux brins respectivement complémentaires des deux précédents à partir de nucléotides présents dans la cellule.

3.2.1.4 Propriétés de l'ADN :

L'ADN, acide désoxyribonucléique, est commercialisé sous forme lyophilisée ; il a alors l'aspect d'un fil épais blanc.

Il est très peu soluble dans les solutions aqueuses : il faut le solubiliser lentement en alternant agitation, chauffage, en prenant soin de ne pas dépasser 80°C au-delà desquels l'ADN est dénaturé.

a. Spectre de l'ADN (figure n°23)

Le spectre d'une solution d'ADN à 0,1 mg/ml dans un tampon TRIS pH = 7,4 , en prenant comme référence ce même tampon, montre deux pics d'absorption :

- un pic d'absorption à 258 nm caractéristique de l'ADN ;
- un autre à 208 nm très certainement dû à la présence de nucléotides ou bases azotées à l'état libre dans la solution.

Notons que l'ADN absorbe uniquement dans l'ultra-violet.

b. Dénaturation de l'ADN : (figure n°24)

Si on étudie la densité optique de l'ADN à 260 nm en fonction de la température, on observe qu'au-delà de 80°C, la densité optique augmente et qu'à partir de 83°C l'ADN est dénaturé : les liaisons hydrogènes sont rompues et la double hélice est détruite.

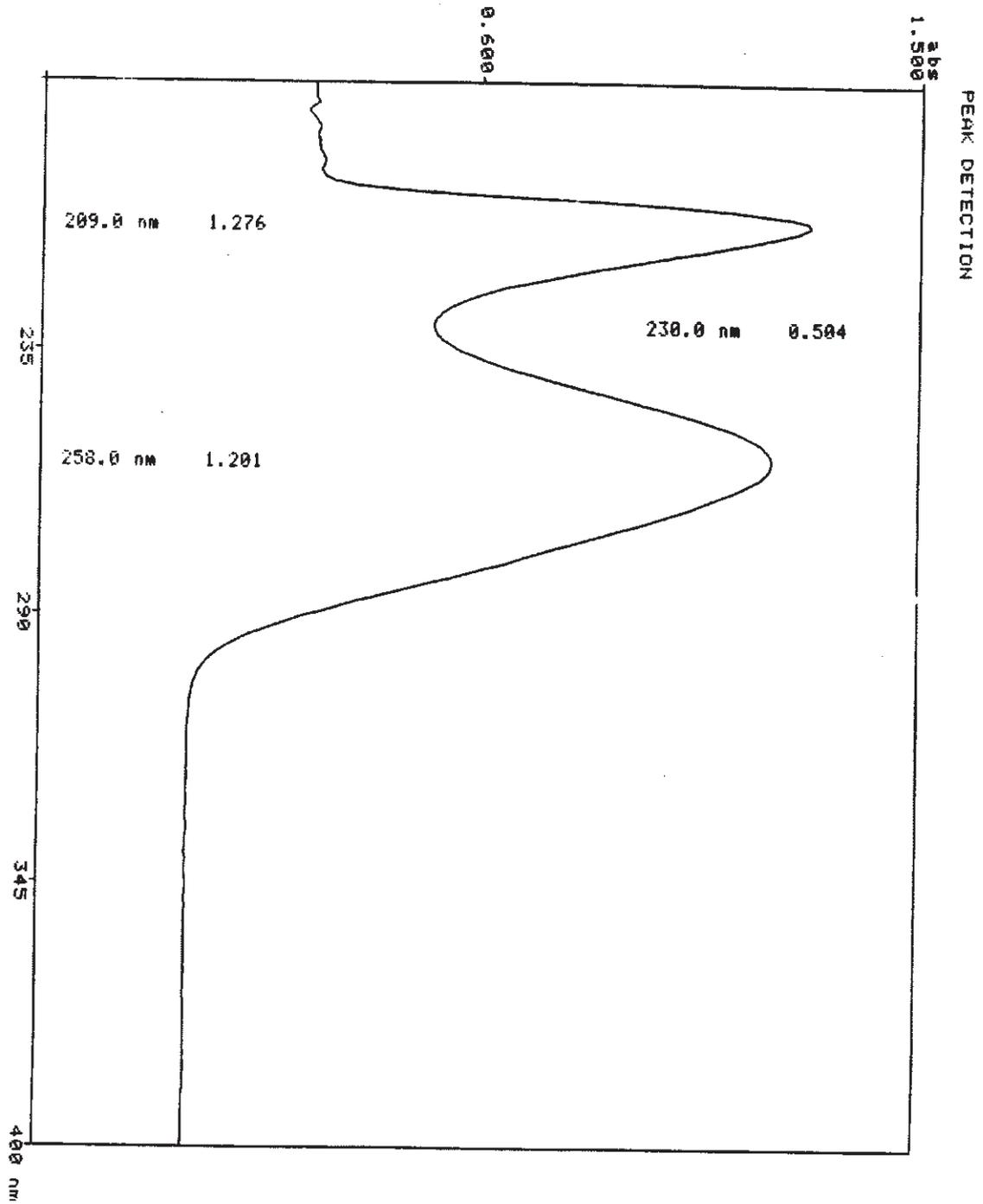


Figure n°23 : Spectre de l'ADN.

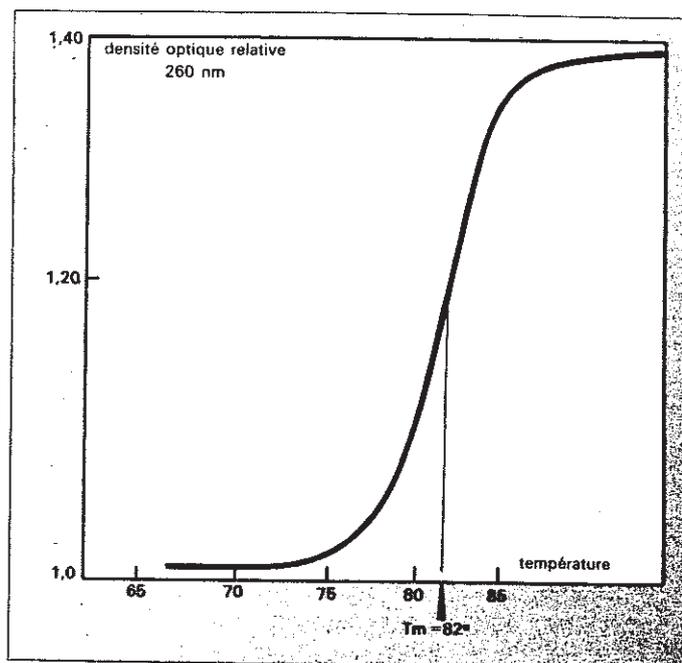


figure n°24 : Spectre de dénaturation de l'ADN [14].

3.2.2 Les substances anticancéreuses utilisées

Les intercalants ADN sont des substances dont la structure et la conformation leur permettent de s'insérer parallèlement aux plateaux de paires de bases de l'ADN.

Ces substances sont phase dépendantes et agissent sur la phase S du cycle cellulaire (phase de synthèse de l'ADN).

Cette constatation est l'une des bases de notre raisonnement pour l'étude des liaisons ioniques ou semi-ioniques entre ADN et intercalants ADN ; en effet, l'intercalation en phase S ne peut se produire que sur une colonie de cellules capables de se diviser, la réplication de l'ADN étant une période prémitotique.

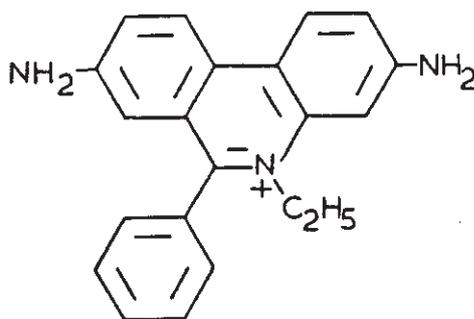
Or l'étude menée au laboratoire a été faite avec de l'ADN seul, donc incapable de se dupliquer ; on a donc pu supposer que si des liaisons étaient mises en évidence, elles ne seraient pas covalentes (dus à l'intercalation d'une molécule médicamenteuse au sein de l'ADN), mais de type ionique ou semi-ionique, externes à la molécule d'ADN.

Les substances choisies pour réaliser cette étude présentent de façon naturelle ou par mésomérie, au moins un **groupement électrophile**.

3.2.2.1 Le bromure d'éthidium

Cette substance est commercialisée sous la forme d'une poudre rougeâtre donnant en solution aqueuse un liquide rouge-orangé .

Formule développée



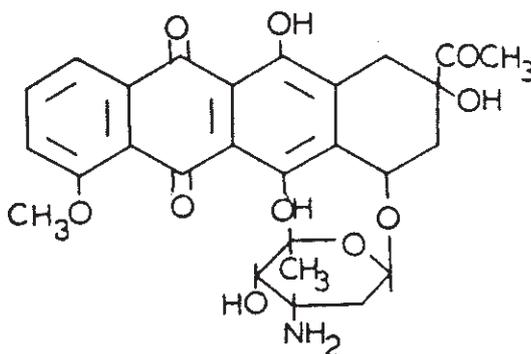
Poids moléculaire : PM = 394,3 g/mole

Le bromure d'éthidium est une molécule possédant une activité anticancéreuse connue mais non utilisée en thérapeutique car beaucoup trop toxique pour l'organisme : le bromure d'éthidium ne doit en effet pas être mis en contact avec la peau ou les muqueuses car il peut provoquer des dommages génétiques.

3.2.2.2 La daunomycine

Elle se présente sous forme d'une poudre lyophilisée rougeâtre et donne en solution aqueuse un liquide orangé.

Formule développée



Poids moléculaire : $PM = 564 \text{ g/mole}$

La daunomycine ou daunorubicine (DCI) ou rubidomycine ou méthoxy-4 trihydroxy-6,9,11 tétrahydro-7,8,9,10 (tridésoxy-2,3,6 amino-3L-lysohexopyranosyl-1) oxy-7 acétyl-9 naphtacène quinone-5,12 est un anticancéreux commercialisé depuis 1985 sous le nom de CERUBIDINE*.

Ses propriétés indiquées par le dictionnaire Vidal* sont:

- Antinéoplasique cytostatique de la famille des Anthracyclines (antibiotique).
- La CERUBIDINE* interagit avec l'ADN en s'intercalant entre deux bases adjacentes provoquant des changements de structure et de fonction des molécules d'ADN.

La CERUBIDINE* est indiquée lors :

- ⇒ des leucémies aigües
- ⇒ des leucémies myéloïdes chroniques
- ⇒ de la maladie de Hodgkin
- ⇒ des lymphomes non Hodgkiniens .

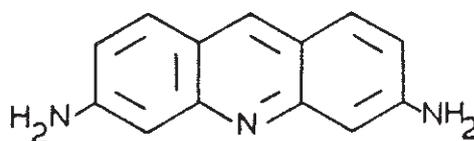
Ce médicament est inscrit à la liste I .

3.2.2.3 *La proflavine*

Elle se présente sous forme d'une poudre rouge-orangée donnant en solution aqueuse un liquide jaune fluorescent.

Elle appartient au groupe des vitamines mais n'est pas commercialisée.

Formule développée

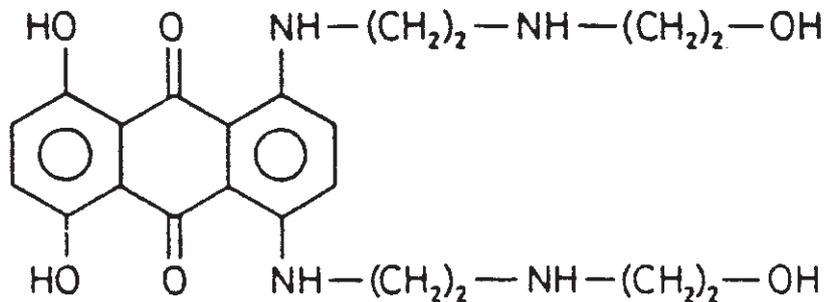


Poids moléculaire : $PM = 245,7 \text{ g/mole}$

3.2.2.4 La mitoxantrone

Elle se présente sous forme d'une poudre bleue donnant en solution aqueuse un liquide bleu.

Formule développée



Poids moléculaire : $PM = 232,31 \text{ g/mole}$

La mitoxantrone est commercialisée sous le nom de NOVANTRONE* ; c'est un antinéoplasique cytostatique appartenant à la famille des anthracènediones de synthèse.

3.2.3 Méthode de détection

3.2.3.1 Introduction

Plumbridge et Brown [20,21,22] avaient déjà soupçonné l'existence de l'établissement de liaisons externes entre ADN et certaines molécules anticancéreuses.

Il fallait prouver l'existence de ces liaisons et en déterminer la nature.

Etant en présence, d'une part de **molécules avec un ou plusieurs groupements électrophiles**, d'autre part d'une **macromolécule d'ADN** contenant de nombreux **doublets libres d'électrons** portés par les atomes d'oxygène, les atomes d'azote, nous avons supposé que si un **complexe ADN-intercalant** se formait *in vitro* (pas de réplication de l'ADN), des

liaisons de type ionique ou semi-ionique pouvaient être à l'origine de la formation de ce complexe par transfert de charge.

Par analogie avec la formation de complexes iodés par transfert de charge (iode moléculaire et molécules électrodonneuses) qui montre que lorsqu'il s'établit une liaison ionique et qu'il se forme un complexe moléculaire, une **étude spectrophotométrique** précise donne un **point isobestique** ; celui-ci est caractéristique puisque le complexe absorbe à une longueur d'onde différente de celle du donneur et de l'accepteur.

Nous avons donc choisi de copier cette méthode et de voir s'il était possible d'obtenir des **points isobestiques** et des **bandes de transfert de charge (BTC)** avec des intercalants ADN.

3.2.3.2 Matériel utilisé

Le spectrophotomètre UV-visible utilisé pour réaliser les spectres est le Perkin Elmer 554.

L'échantillon liquide à étudier est placé dans une cuve en quartz (matériau transparent aux UV) à un emplacement tel qu'il soit traversé par un faisceau lumineux monochromatique dont la longueur d'onde variera.

Les cuves en quartz utilisées sont de type HELMA 110 QS, de 10 mm de parcours optique.

La mesure se fait toujours par rapport à une référence placée à côté de l'échantillon.

L'enceinte contenant les cuves de référence et de mesure est thermostatée et permet donc de réaliser le spectre à une température constante choisie par l'expérimentateur.

Le Perkin Elmer, en balayant l'intervalle de longueurs d'ondes choisi par l'expérimentateur (entre 190 et 800 nm), mesure à chaque instant la densité optique de l'échantillon ; il indique cette dernière et trace simultanément sur un papier quadrillé la courbe $d.o = f(\text{longueur d'onde})$ qui constitue le spectre.

Programmation du Perkin Elmer :

Par exemple pour un spectre allant de 190 à 700 nm

- REP SCAN ; OVER ; FULL RANGE ; REP SCAN .
- 190 LOAD λ
- 700 LOAD λ
- CHECK + LOAD λ
- 700 GO TO λ

Puis, il faut réaliser le zéro d'absorbance (ou le 100% de transmission) à :

$$(190 + 700) / 2 = 445 \text{ nm}$$

3.2.4 Protocole expérimental

La mise en place du protocole expérimental est basée sur un certain nombre de :

- constatations : les bases azotées de l'ADN possèdent des doublets libres sur l'atome d'azote, d'oxygène ; les substances que l'on a choisi d'étudier possèdent des groupements électrophiles ;
- hypothèses : des liaisons par transfert de charge sont susceptibles de s'établir entre l'ADN et les substances intercalantes.

Or il est bien connu que ces mêmes intercalants établissent avec l'ADN des liaisons covalentes lors de la réplication de l'ADN (phase S) quand l'anticancéreux vient s'intercaler parallèlement aux plateaux de paires de bases de l'ADN.

Le problème était double : d'une part, rendre inexistante ou indétectable cette liaison covalente, d'autre part, mettre en évidence d'éventuels complexes formés par transfert de charge.

La combinaison des deux événements suivants nous a permis de pallier à ce double problème.

- La liaison covalente peut être supprimée si la phase S est rendue inexistante ; pour cela, il suffit de travailler avec de l'ADN seul (lyophilisé).

- Les complexes formés par transfert de charge peuvent être mis en évidence par une étude spectrophotométrique visible et UV donnant respectivement un point isobestique et une bande de transfert de charge.

Les expériences menées ont permis de réaliser une étude uniquement qualitative de l'établissement de liaisons ioniques entre ADN et médicaments.

En effet, il ne nous a pas été possible de calculer les constantes de formation des complexes étant donné que nous ne connaissions pas le poids moléculaire de l'ADN utilisé.

C'est pour cette même raison que les concentrations des solutions d'ADN seront toujours exprimées en mg/ml.

Pour chaque médicament, nous réalisons un spectre d'une solution de médicament à une concentration telle que le pic d'absorption soit exploitable : c'est-à-dire pas trop faible pour que l'éventuel point isobestique soit visible et pas trop important pour que la loi de Beer Lambert soit encore vérifiée ($d.o < 1$).

Ensuite, nous réalisons successivement les spectres de mélanges contenant la solution de médicament et la solution d'ADN (à différentes concentrations) en quantités égales.

On pourrait penser qu'il serait plus judicieux de travailler avec des concentrations d'ADN constantes et des concentrations variables de solutions médicamenteuses ; en effet, ceci semblerait plus proche des conditions physiologiques : l'ADN est constant dans l'organisme et la quantité de médicament administrée peut être variable.

Mais, nous avons constaté que l'ADN seul absorbait à 260 nm alors que le complexe formé entre ADN et médicament absorbait vers 450-550 nm, longueur d'onde proche de celle correspondant à l'absorption de la solution de médicament seul.

3.2.4.1 Tampon utilisé

Lors des expériences réalisées, l'ADN et les substances médicamenteuses sont solubilisés dans un tampon TRIS de pH = 7,9 .

Préparation du tampon :

- Trizma HCl = 4,88 g.l⁻¹
- Trizma base = 2,3 g.l⁻¹

Ainsi pour préparer 250 ml de tampon, mettre dans une fiole jaugée de 250 ml :

- 1,22 g de Trizma HCl
- 0,575 g de Trizma base
- eau distillée qsp 250 ml

Vérifier le pH avec le pHmètre et, le cas échéant, ajuster avec de l'acide ou de la base le pH à 7,9.

3.2.4.2 Spectres visibles

*** Premier spectre :**

- 3 ml de tampon dans une cuve en quartz placée dans le faisceau de référence.
- Dans l'autre cuve : 1,5 ml de tampon + 1,5 ml de solution médicamenteuse à environ $1,25 \cdot 10^{-4}$ M.

Les spectres suivants sont tracés sur la même feuille que le précédent.

La référence est toujours la même : 3 ml de tampon.

*** Deuxième spectre :**

- 1,5 ml de solution de médicament à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M

+ 1,5 ml de solution d'ADN à 1,28 mg/ml .

*** Troisième spectre :**

- 1,5 ml de solution de médicament à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M

+ 1,5 ml de solution d'ADN à 0,64 mg/ml

et ainsi de suite jusqu'à obtention d'un spectre identique à celui représentant le médicament seul ce qui signifie que l'ADN est en quantité trop faible et ne se combine pas avec le médicament au point de modifier l'absorption : le médicament reste largement majoritaire.

3.2.4.3 Spectres UV

Nous réalisons ensuite, pour chaque substance étudiée, les spectres UV pour déceler la présence d'une BTC (Bande de Transfert de Charge).

Dans l'UV il faudra travailler avec des solutions diluées au 1/10^{ème} par rapport aux solutions précédentes.

*** Courbe 1 :**

1,5 ml de médicament + 1,5 ml de tampon *contre* référence = 3 ml de tampon

*** Courbe 2 :**

1,5 ml d'ADN + 1,5 ml de tampon *contre* référence = 3 ml de tampon

*** Courbe 3 :**

1,5 ml de médicament + 1,5 ml d'ADN *contre* référence = 3 ml de tampon

*** Courbe 4 :**

1,5 ml de médicament + 1,5 ml d'ADN *contre* 1,5 ADN + 1,5 tampon dans le faisceau de référence.

Nous déterminons ensuite graphiquement s'il y a une BTC en faisant (courbe 1) - (courbe 4).

3.3 RESULTATS

3.3.1 Etude de quatre substances

L'étude de formation de complexes par transfert de charge a été réalisée pour quatre substances : le bromure d'éthidium, la daunomycine, la proflavine et la mitoxantrone.

3.3.1.1 Le bromure d'éthidium [26]

Le bromure d'éthidium possède la propriété de s'intercaler même *in vitro* à la molécule d'ADN, par son groupement phényle (structure plane). Dans ce cas présent, les éventuelles liaisons covalentes entre l'ADN et le groupement phényle sont rendues indétectables par la méthode spectrophotométrique.

a. Spectres visibles (figure n°25)

Nous avons réalisé une série de spectres où seule la concentration en ADN, supposé donneur d'électrons, variait.

Préparation des solutions :

- ◆ Solution tampon TRIS pH = 7,9

Trizma HCl : 4,88 g/l

Trizma base : 2,3 g/l

- ◆ Solution du bromure d'éthidium : à $1,25 \cdot 10^{-4}$ mole/l

PM du bromure d'éthidium = 394,3 g/mole

Pour préparer 100 ml de solution $1,25 \cdot 10^{-4}$ M, il faut peser 0,00492875 g de bromure d'éthidium.

- ◆ Solution d'ADN :

Nous préparons une solution mère d'ADN à 0,32 mg/ml.

Nous diluerons ensuite cette solution au 1/2 , 1/4 , 1/8 , 1/16 , ...

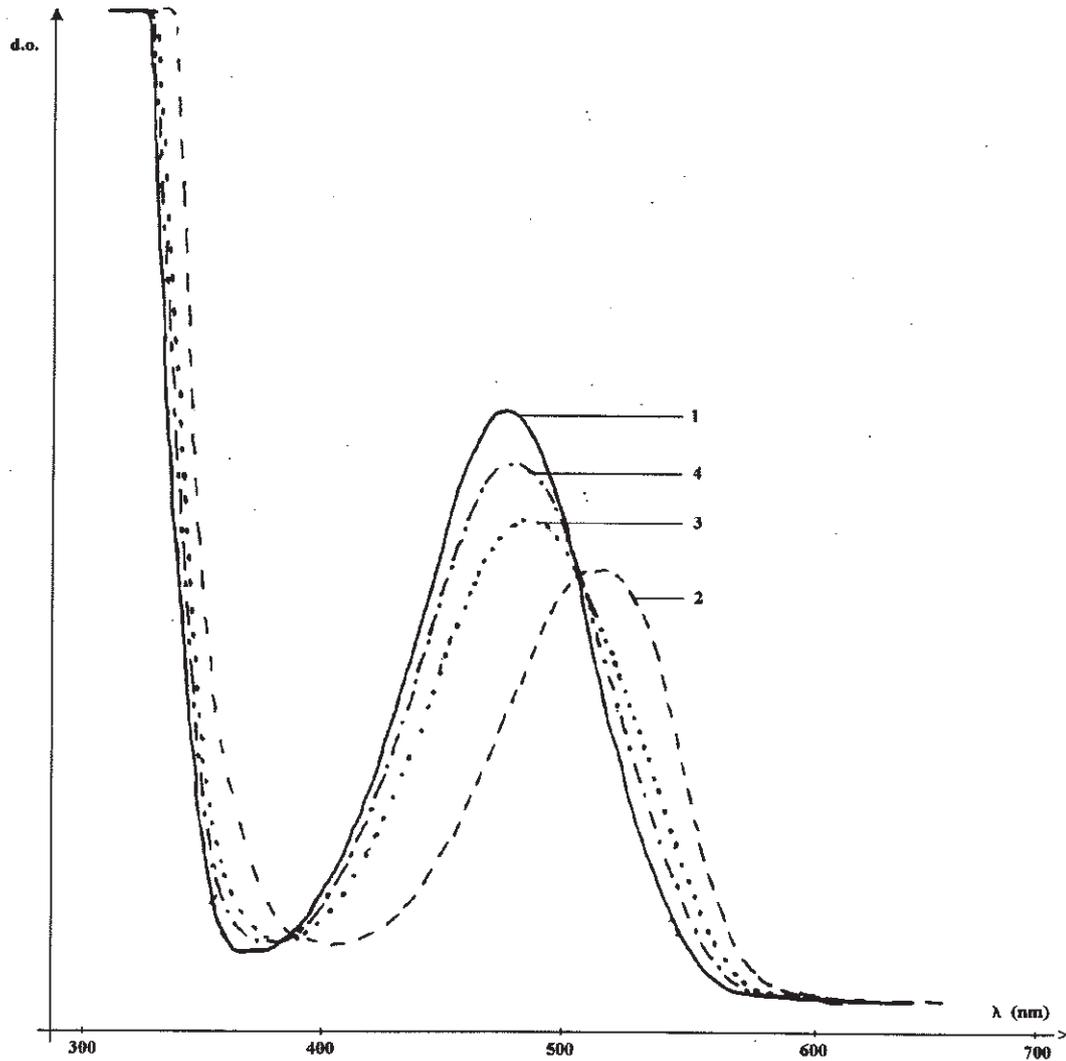


Figure n° 25 : Spectres d'absorption visible de l'ADN et du bromure d'éthidium $= 1,25 \cdot 10^{-4}$ M dans tampon Tris pH = 7,9. Les concentrations de l'ADN sont (1) 0 mg/ml, (2) 0,32 mg/ml, (3) 0,16 mg/ml, (4) 0,04mg/ml.

Comme il est indiqué dans le protocole expérimental, la cuve de référence contient toujours 3 ml de tampon et l'autre cuve contient successivement :

- **Courbe 1** : 1,5 ml de tampon pH = 7,9
+ 1,5 ml de bromure d'éthidium à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 2** : 1,5 ml d'ADN à 0,32 mg/ml
+ 1,5 ml de bromure d'éthidium à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 3** : 1,5 ml d'ADN à 0,16 mg/ml
+ 1,5 ml de bromure d'éthidium à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 4** : 1,5 ml d'ADN à 0,04 mg/ml
+ 1,5 ml de bromure d'éthidium à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M

Remarque :

Dans les cuves en quartz de 3 ml, les concentrations de chacune des solutions mises en jeu sont diminuées de moitié car, à chaque mesure, on réalise une dilution au demi en ajoutant 1,5 ml de solution d'ADN ou de substance dans la cuve.

Un point isobestique apparaît à 508 nm, laissant supposer la formation d'un complexe par transfert de charge entre un donneur et un accepteur.

b. Spectres UV (figure n°26)

Pour vérifier l'hypothèse émise, nous réalisons les spectres UV des solutions suivantes (diluées au 1/10^{ème} par rapport aux spectres visibles) :

- **Courbe 1** : 1,5 ml de bromure d'éthidium $1,25 \cdot 10^{-5}$ M + 1,5 ml de tampon
contre 3 ml de tampon

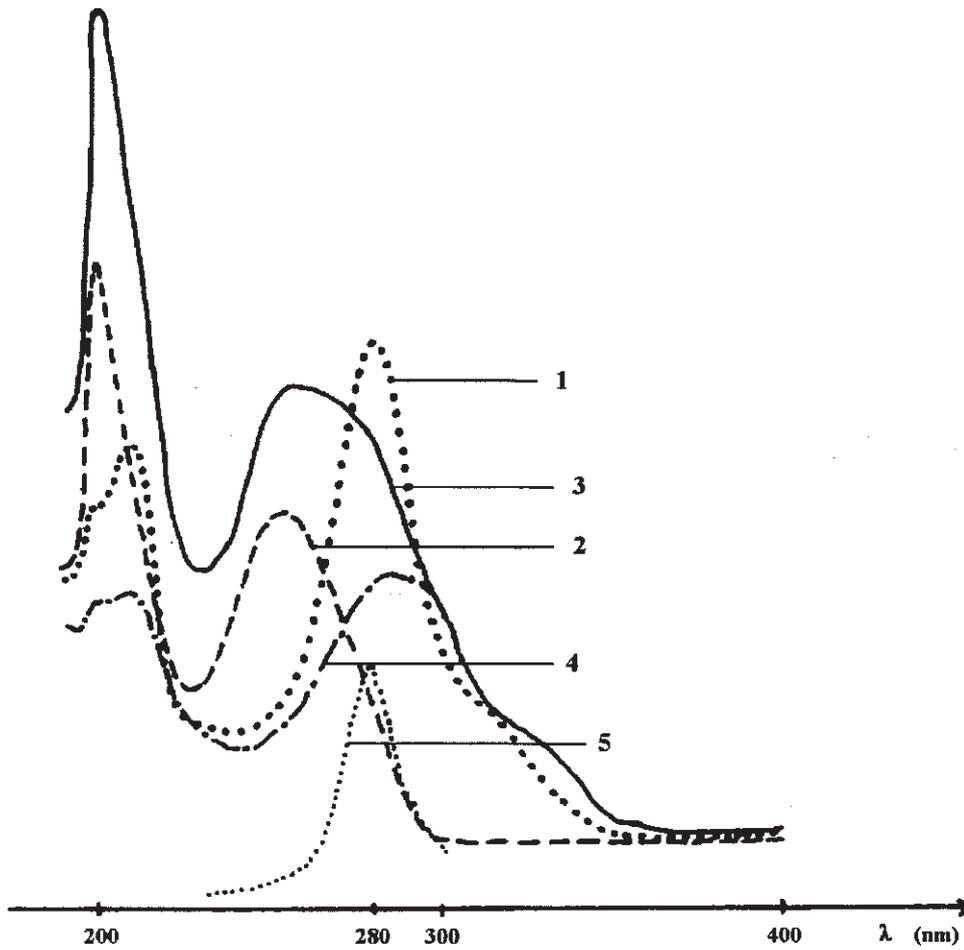


Figure n°26 : Spectres ultraviolets de complexe (ADN-bromure d'éthidium) dans tampon TRIS pH 7,9. Les concentrations sont (1) [bromure d'éthidium] = $1,25 \cdot 10^{-5}$ M, (2) [ADN] = 0,13 mg/ml, (3) [bromure d'éthidium] = $1,25 \cdot 10^{-5}$ M et [ADN] = 0,13 mg/ml, (4) courbe d'absorption bromure d'éthidium et complexe bromure d'éthidium -ADN, (5) courbe d'absorption calculée du complexe.

- **Courbe 2** : 1,5 ml d'ADN à 0,13 mg/ml + 1,5 ml de tampon
contre 3 ml de tampon

- **Courbe 3** : 1,5 ml de bromure d'éthidium + 1,5 ml d'ADN
contre 3 ml de tampon

- **Courbe 4** : 1,5 ml de bromure d'éthidium + 1,5 ml d'ADN
contre 1,5 ml d'ADN + 1,5 ml de tampon

Graphiquement nous faisons :

Courbe 1 - Courbe 4

Il apparaît une BTC caractéristique d'un complexe formé à 208 nm.

3.3.1.2 La daunomycine

a. Spectres visibles (figure n°27)

Nous avons réalisé une série de spectres où seule la concentration en ADN, supposé donneur d'électrons, variait.

Préparation des solutions :

◆ Solution tampon : pH = 7,9

Trizma HCl : 4,88 g/l

Trizma base : 2,3 g/l

◆ Solution de daunomycine à $1,25 \cdot 10^{-4}$ mole/l

PM de la daunomycine = 564 g/mole

Pour préparer 100 ml de solution $1,25 \cdot 10^{-4}$ M, il faut peser 0,00705 g de daunomycine.

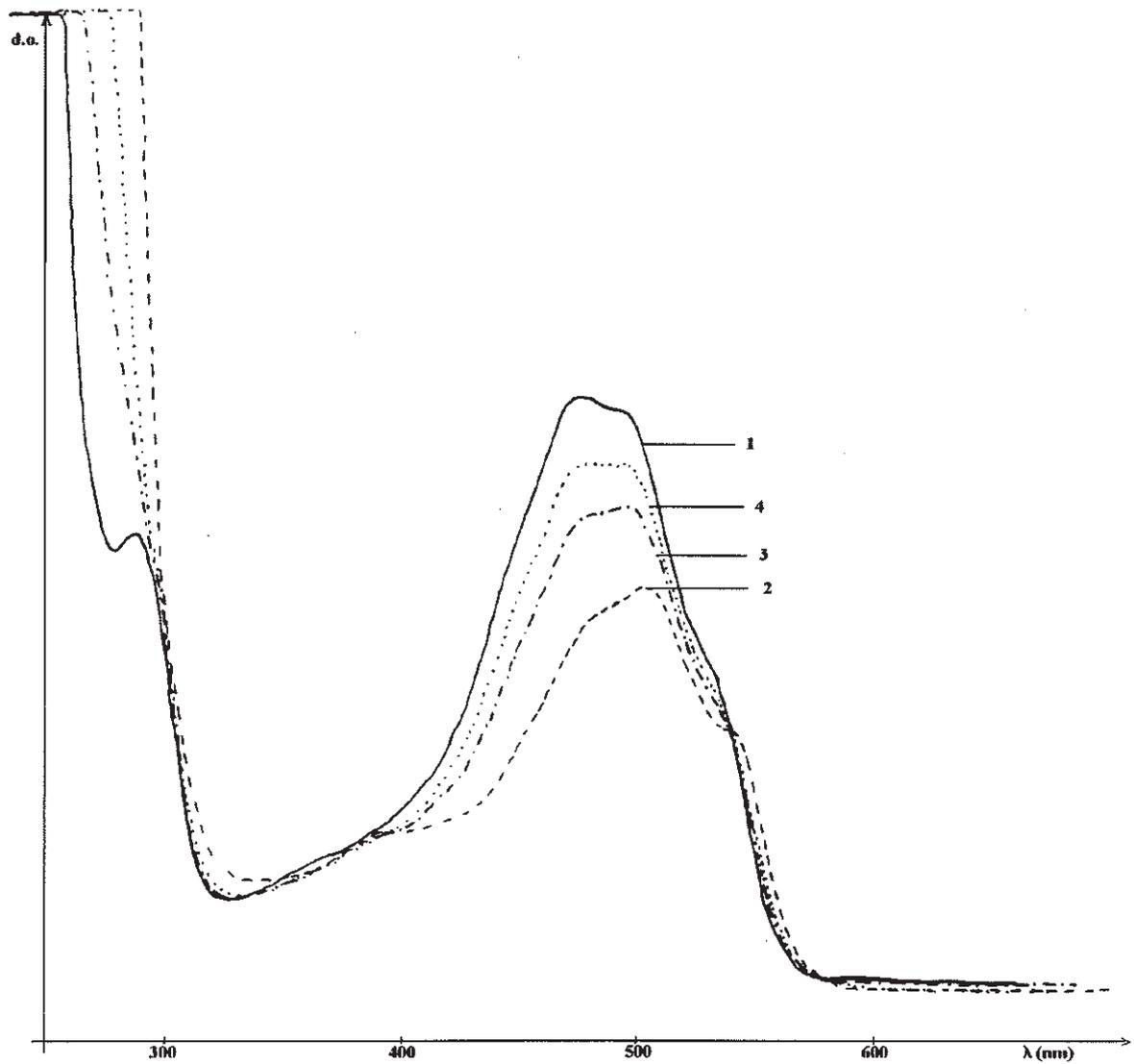


Figure n° 27 : Spectres d'absorption visible de l'ADN et de la daunomycine = $1,25 \cdot 10^{-4}$ M dans tampon Tris pH = 7,9. Les concentrations de l'ADN sont (1) 0 mg/ml, (2) 0,32 mg/ml, (3) 0,08 mg/ml, (4) 0.02 g/ml.

◆ Solution d'ADN :

Nous préparons une solution mère d'ADN à 0,32 mg/ml.

Nous diluerons ensuite cette solution au 1/2 , 1/4 , 1/8 , 1/16 , ...

Comme il est indiqué dans le protocole expérimental, la cuve de référence contient toujours 3 ml de tampon et l'autre cuve contient successivement :

- **Courbe 1** : 1,5 ml de tampon pH = 7,9
+ 1,5 ml de daunomycine à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M

- **Courbe 2** : 1,5 ml d'ADN à 0,32 mg/ml
+ 1,5 ml de daunomycine à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M

- **Courbe 3** : 1,5 ml d'ADN à 0,08 mg/ml
+ 1,5 ml de daunomycine à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M

- **Courbe 4** : 1,5 ml d'ADN à 0,02 mg/ml
+ 1,5 ml de daunomycine à $1,25 \cdot 10^{-4}$ M

Remarque :

Dans les cuves en quartz de 3 ml, les concentrations de chacune des solutions mises sont diminuées de moitié car, à chaque mesure, on réalise une dilution au demi en ajoutant 1,5 ml de solution d'ADN ou de substance dans la cuve.

Un point isobestique apparaît à 545 nm, laissant supposer la formation d'un complexe par transfert de charge entre un donneur et un accepteur.

b. Spectres UV (figure n°28)

Pour vérifier l'hypothèse émise, nous réalisons les spectres UV des solutions suivantes (diluées au 1/10^{ème} par rapport aux spectres visibles) :

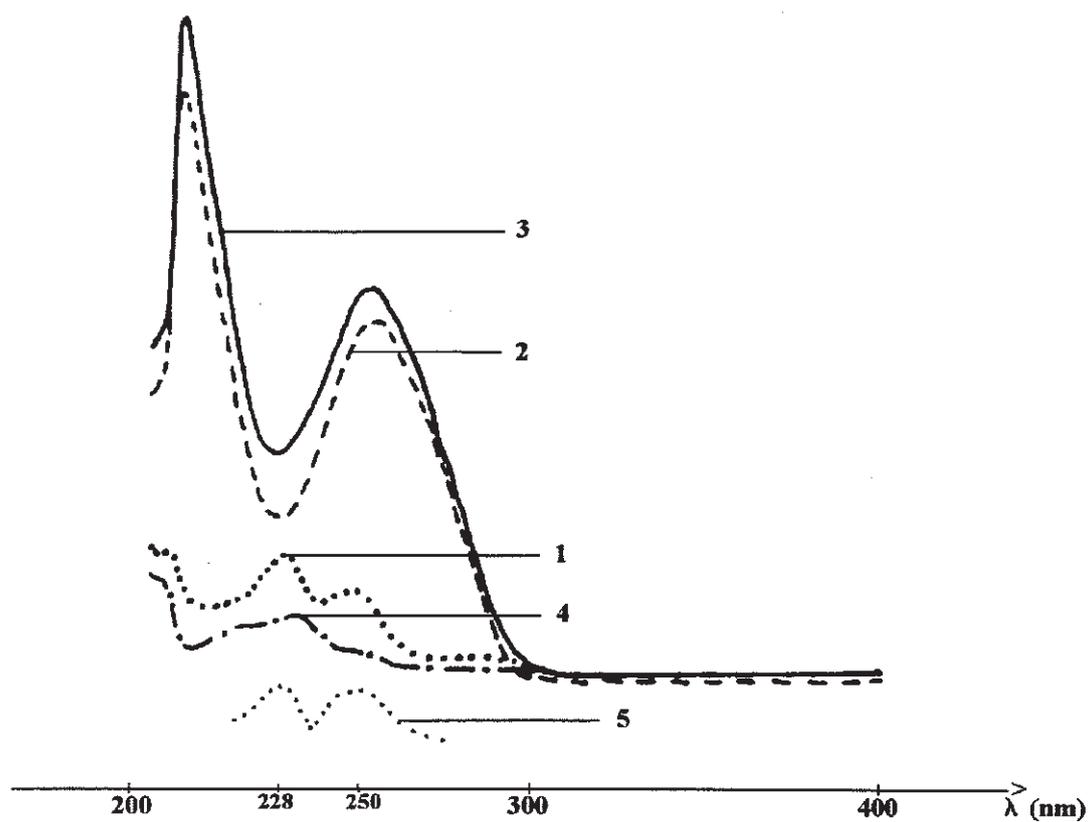


Figure n°28 : Spectres ultraviolets de complexe (ADN-daunomycine) dans tampon TRIS pH 7,9. Les concentrations sont (1) [daunomycine] = $1,25 \cdot 10^{-5}$ M , (2) [ADN] = 0,13 mg/ml, (3) [daunomycine] = $1,25 \cdot 10^{-5}$ M et [ADN] = 0,13 mg/ml, (4) courbe d'absorption daunomycine et complexe daunomycine -ADN, (5) courbe d'absorption calculée de l'éventuel complexe.

- **Courbe 1** : 1,5 ml de daunomycine $1,25 \cdot 10^{-5}$ M + 1,5 ml de tampon
contre 3 ml de tampon
- **Courbe 2** : 1,5 ml d'ADN à 0,13 mg/ml + 1,5 ml de tampon
contre 3 ml de tampon

- **Courbe 3** : 1,5 ml de daunomycine + 1,5 ml d'ADN
contre 3 ml de tampon

- **Courbe 4** : 1,5 ml de daunomycine + 1,5 ml d'ADN
contre 1,5 ml d'ADN + 1,5 ml de tampon

Graphiquement nous faisons :

Courbe 1 - Courbe 4

Il n'apparaît pas de bande de transfert de charge confirmant la formation d'un complexe.

3.3.1.3 La proflavine

a. Spectres visibles (figure n°29)

Nous avons réalisé une série de spectres où seule la concentration en ADN, supposé donneur d'électrons, variait.

Préparation des solutions :

- ◆ Solution tampon : pH = 7,9

Trizma HCl : 4,88 g/l

Trizma base : 2,3 g/l

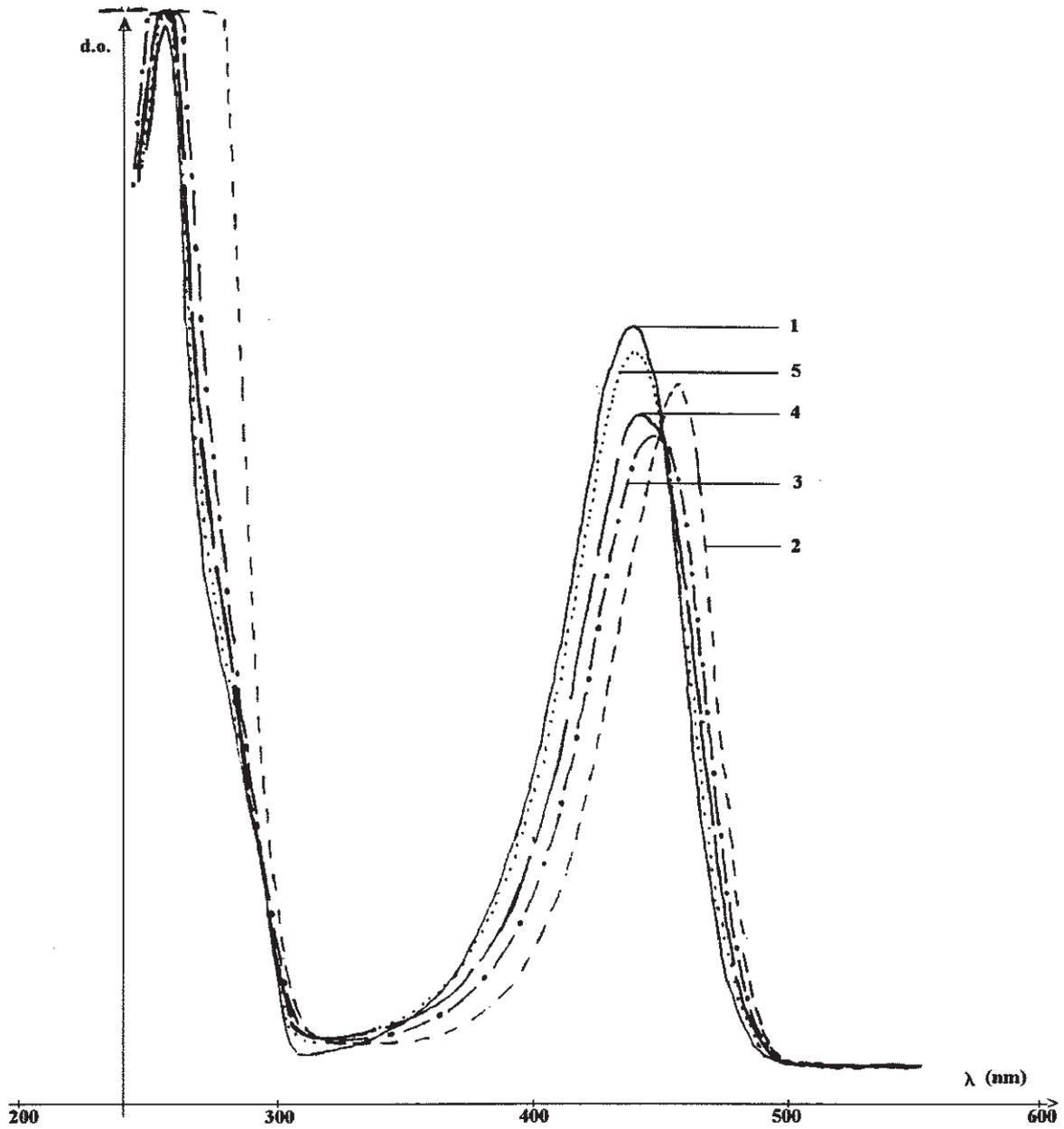


Figure n° 29 : Spectres d'absorption visible de l'ADN et de la proflavine = $7,95 \cdot 10^{-4}$ M dans tampon Tris pH = 7,9. Les concentrations de l'ADN sont (1) 0 mg/ml, (2) 1,28 mg/ml, (3) 0,32 mg/ml, (4) 0,08mg/ml, (5) 0,02 mg/ml.

◆ Solution de proflavine

Nous avons réalisé de nombreux spectres de proflavine en solution, et c'est pour une solution à une concentration de $7,95 \cdot 10^{-4}$ M que nous avons obtenu le pic le plus exploitable.

PM de la proflavine = 245,7 g/mole.

Pour préparer 100 ml de solution $7,95 \cdot 10^{-4}$ M, il faut peser 0,0195 g de proflavine.

◆ Solution d'ADN

Nous préparons une solution mère d'ADN à 1,28 mg/ml.

Nous diluons ensuite cette solution au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, ...

Comme il est indiqué dans le protocole expérimental, la cuve de référence contient toujours 3 ml de tampon et l'autre cuve contient successivement :

- **Courbe 1** : 1,5 ml de tampon pH = 7,9
+ 1,5 ml de proflavine $7,95 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 2** : 1,5 ml d'ADN à 1,28 mg/ml
+ 1,5 ml de proflavine $7,95 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 3** : 1,5 ml d'ADN à 0,32 mg/ml
+ 1,5 ml de proflavine $7,95 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 4** : 1,5 ml d'ADN à 0,08 mg/ml
+ 1,5 ml de proflavine à $7,95 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 5** : 1,5 ml d'ADN à 0,02 mg/ml
+ 1,5 ml de proflavine à $7,95 \cdot 10^{-4}$ M

Remarque :

Dans les cuves en quartz de 3 ml, les concentrations de chacune des solutions mises sont diminuées de moitié car, à chaque mesure, on réalise une dilution au demi en ajoutant 1,5 ml de solution d'ADN ou de substance dans la cuve.

Un point isobestique apparaît à 450 nm, laissant supposer la formation d'un complexe par transfert de charge entre un donneur et un accepteur.

b - Spectres UV (figure n°30)

Pour vérifier l'hypothèse émise, nous réalisons les spectres UV avec des solutions d'ADN et de proflavine diluées : 0,13 mg/ml pour la solution d'ADN, $1,25 \cdot 10^{-5}$ M pour la solution de proflavine.

- **Courbe 1** : 1,5 ml de proflavine $1,25 \cdot 10^{-5}$ M + 1,5 ml de tampon

contre 3 ml de tampon

- **Courbe 2** : 1,5 ml d'ADN à 0,13 mg/ml + 1,5 ml de tampon

contre 3 ml de tampon

- **Courbe 3** : 1,5 ml de proflavine + 1,5 ml d'ADN

contre 3 ml de tampon

- **Courbe 4** : 1,5 ml de proflavine + 1,5 ml d'ADN

contre 1,5 ml d'ADN + 1,5 ml de tampon

Graphiquement nous faisons :

Courbe 1 - Courbe 4

Il apparaît une BTC caractéristique d'un complexe formé à 258 nm.

3.3.1.4 La mitoxantrone

a. Spectres visibles (figure n°31)

Nous avons réalisé une série de spectres où seule la concentration en ADN, supposé donneur d'électrons, variait.

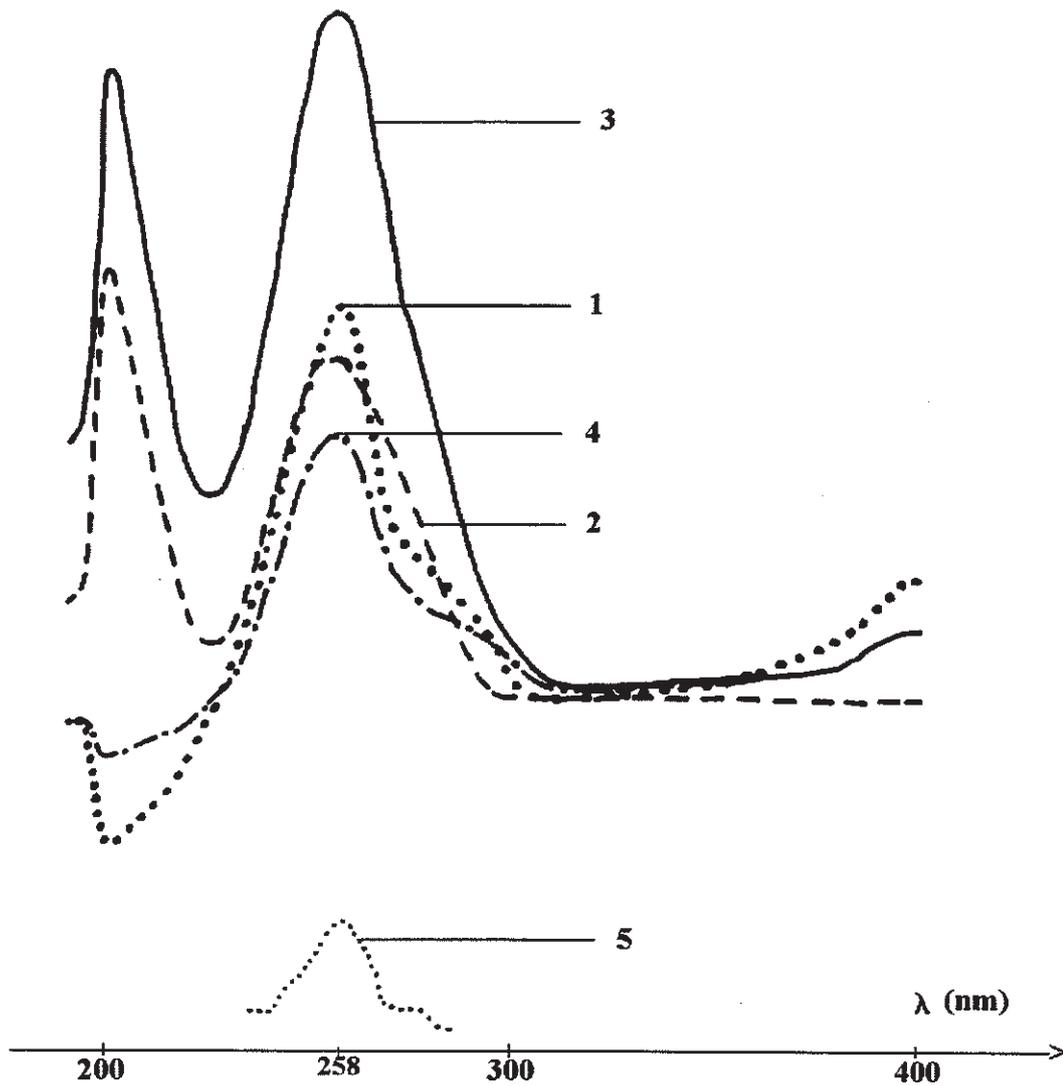


Figure n°30 : Spectres ultraviolets de complexe (ADN-proflavine) dans tampon TRIS pH 7,9. Les concentrations sont (1) [proflavine] = $1,25 \cdot 10^{-5}$ M , (2) [ADN] = 0,13 mg/ml, (3) [proflavine] = $1,25 \cdot 10^{-5}$ M et [ADN] = 0,13 mg/ml, (4) courbe d'absorption proflavine et complexe proflavine-ADN, (5) courbe d'absorption calculée du complexe.

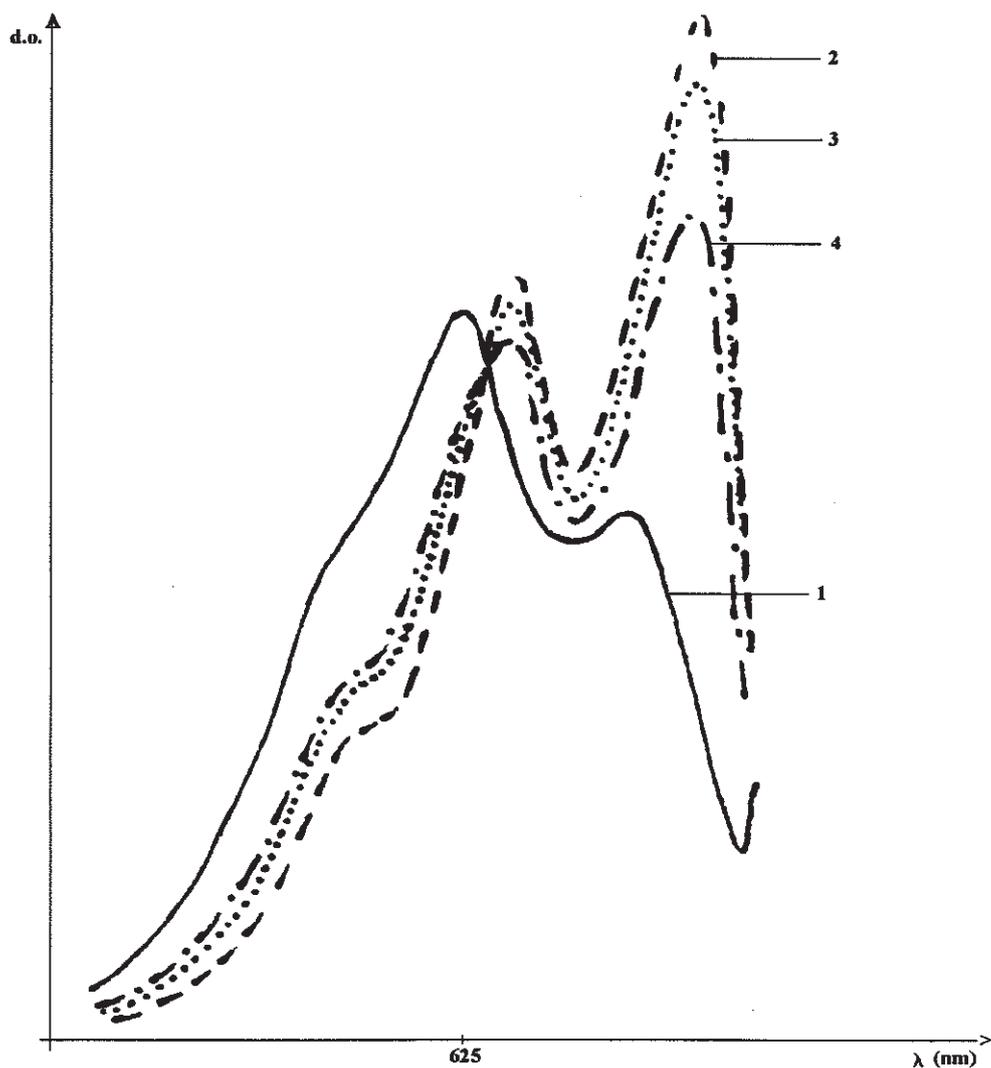


Figure n° 31 : Spectres d'absorption visible de l'ADN et de la mitoxantrone = $1,5 \cdot 10^{-4}$ M dans tampon Tris pH = 7,9. Les concentrations de l'ADN sont (1) 0 mg/ml, (2) 1,0 mg/ml, (3) 0,4 mg/ml, (4) 0.1mg/ml.

Préparation des solutions :

- ◆ Solution tampon : pH = 7,9

Trizma HCl : 4,88 g/l

Trizma base : 2,3 g/l

- ◆ Solution de mitoxantrone à $1,5 \cdot 10^{-4}$ mole/l

PM de la mitoxantrone = 232,315 g/mole

Pour préparer 100 ml de solution $1,5 \cdot 10^{-4}$ M, il faut peser 0,00348 g de mitoxantrone.

- ◆ Solution d'ADN

Nous préparons une solution mère d'ADN à 1 mg/ml.

Nous diluons ensuite cette solution au 2/5, 1/10.

Comme il est indiqué dans le protocole expérimental , la cuve de référence contient toujours 3 ml de tampon et l'autre cuve contient successivement :

- **Courbe 1** : 1,5 ml de tampon pH = 7,9
+ 1,5 ml de mitoxantrone à $1,5 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 2** : 1,5 ml d'ADN à 1 mg/ml
+ 1,5 ml de mitoxantrone à $1,5 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 3** : 1,5 ml d'ADN à 0,4 mg/ml
+ 1,5 ml de mitoxantrone à $1,5 \cdot 10^{-4}$ M
- **Courbe 4** : 1,5 ml d'ADN à 0,1 mg/ml
+ 1,5 ml de mitoxantrone à $1,5 \cdot 10^{-4}$ M

Remarque :

Dans les cuves en quartz de 3 ml, les concentrations de chacune des solutions mises sont diminuées de moitié car, à chaque mesure, on réalise une dilution au demi en ajoutant 1,5 ml de solution d'ADN ou de substance dans la cuve.

Un point isobestique apparaît à 625 nm, laissant supposer la formation d'un complexe par transfert de charge entre un donneur et un accepteur.

b - Spectres UV (figure n°32)

Pour vérifier l'hypothèse émise, nous réalisons les spectres UV avec des solutions d'ADN et de mitoxantrone diluées : 0,13 mg/ml pour la solution d'ADN, $1,25 \cdot 10^{-5}$ M pour la solution de proflavine.

- **Courbe 1** : 1,5 ml de mitoxantrone $1,25 \cdot 10^{-5}$ M + 1,5 ml de tampon
contre 3 ml de tampon

- **Courbe 2** : 1,5 ml d'ADN à 0,13 mg/ml + 1,5 ml de tampon
contre 3 ml de tampon

- **Courbe 3** : 1,5 ml de mitoxantrone + 1,5 ml d'ADN
contre 3 ml de tampon

- **Courbe 4** : 1,5 ml de mitoxantrone + 1,5 ml d'ADN
contre 1,5 ml d'ADN + 1,5 ml de tampon

Graphiquement nous faisons :

Courbe 1 - Courbe 4

Il apparaît une BTC caractéristique d'un complexe formé à 245 nm.

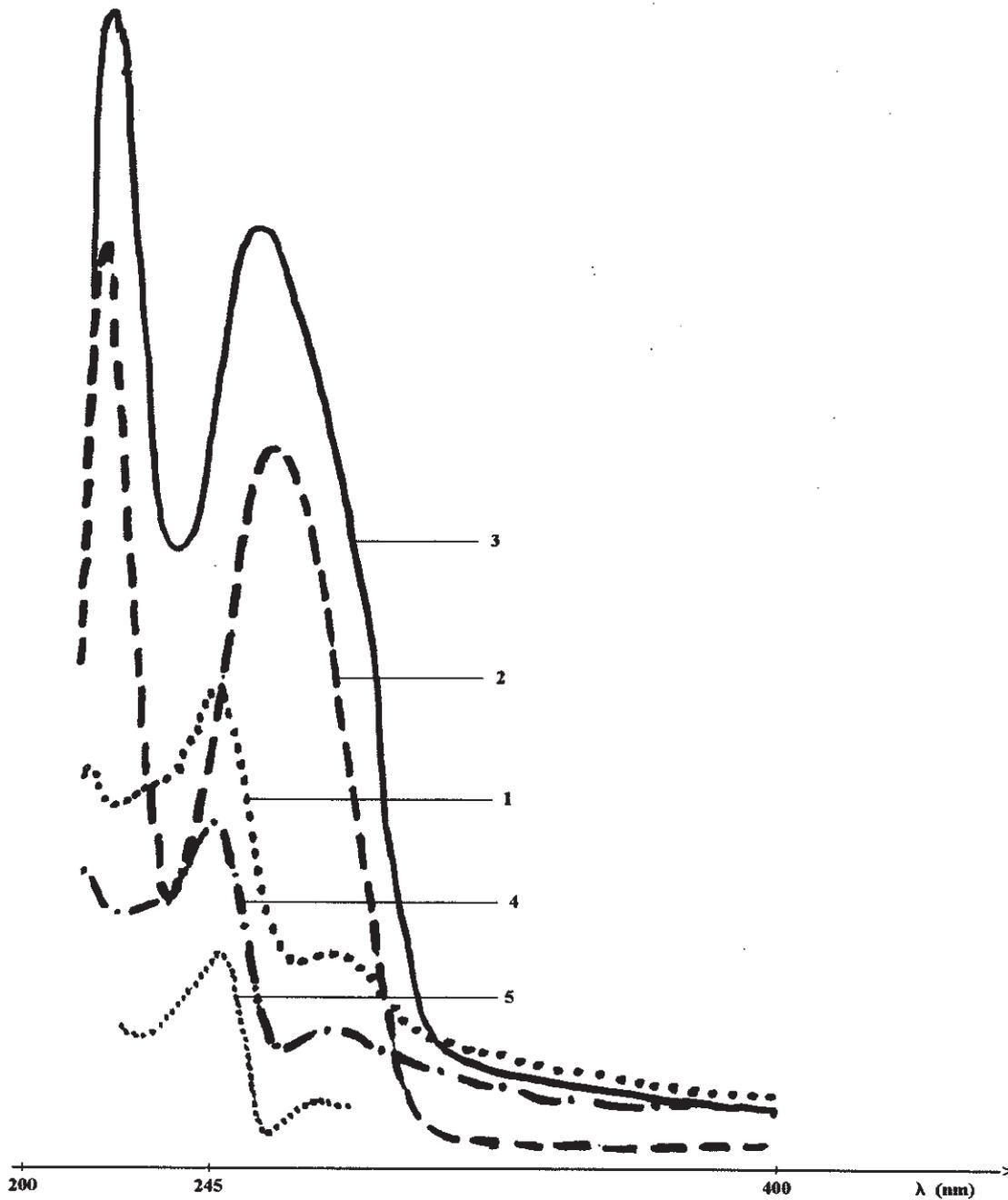


Figure n°32 : Spectres ultraviolets de complexe (ADN-mitoxantrone) dans tampon TRIS pH 7,9. Les concentrations sont (1) [mitoxantrone] = $1,25 \cdot 10^{-5}$ M , (2) [ADN] = 0,13 mg/ml, (3) [mitoxantrone] = $1,25 \cdot 10^{-5}$ M et [ADN] = 0,13 mg/ml, (4) courbe d'absorption mitoxantrone et complexe mitoxantrone-ADN, (5) courbe d'absorption calculée du complexe.

3.3.2 Discussion

L'étude spectrophotométrique visible a montré pour chacune des quatre substances étudiées un point isobestique laissant supposer la formation d'un complexe par transfert de charge entre ADN et intercalant ADN.

L'hypothèse de formation de tels complexes n'a été vérifiée que pour trois des quatre substances étudiées : le bromure d'éthidium, la proflavine et la mitoxantrone. En effet, en ce qui concerne la daunomycine, l'étude spectrophotométrique UV n'a pas mis en évidence de bande de transfert de charge du complexe.

Hypothèse sur l'établissement des liaisons

Les structures, de l'ADN d'une part, des molécules étudiées, d'autre part, ont suscité un certain nombre de suppositions quant à l'établissement des liaisons de type ionique à l'origine de la formation des complexes.

Nous avons supposé que les atomes d'oxygène et d'azote des bases azotées de l'ADN, porteurs de doublets libres d'électrons étaient à l'origine des liaisons ioniques entre la macromolécule d'ADN et les molécules étudiées (**figure n°33**).

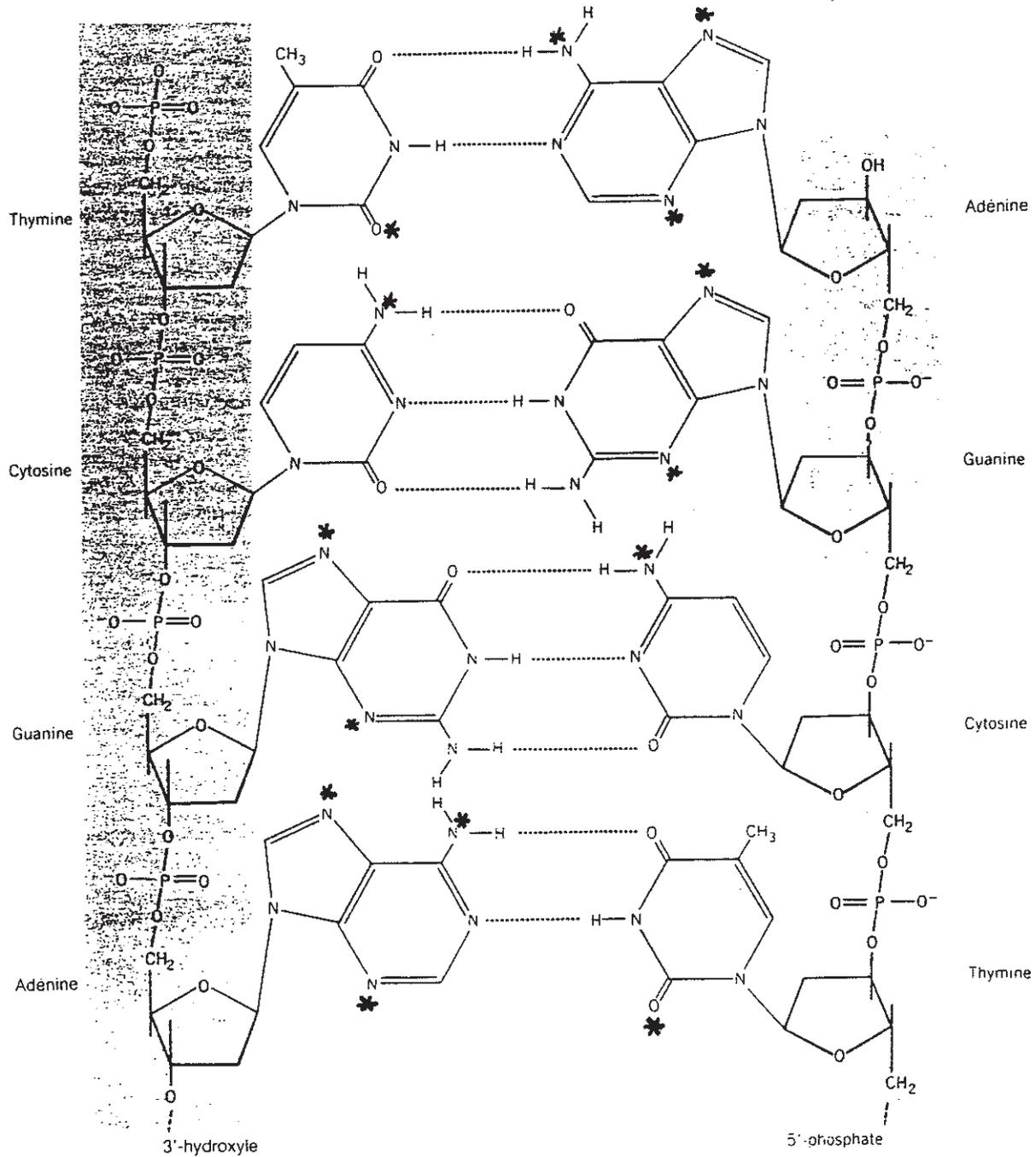


figure n°33 : Portion de la molécule d'ADN : atomes porteurs de doublets libres d'électrons. (*)

⇒ Le **bromure d'éthidium** est une molécule intercalante originale en ce sens qu'elle présente de par sa structure lamellaire la propriété de se glisser entre les paires de bases puriques et pyrimidiques aussi bien *in vivo* qu' *in vitro*.

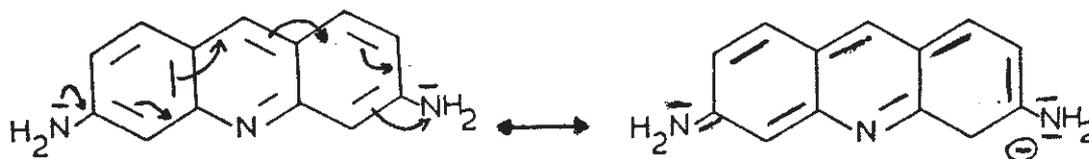
Nous avons étudié la conformation dans l'espace de la molécule de bromure d'éthidium afin de vérifier que les liaisons covalentes ne faussaient pas la mise en évidence de liaisons par transfert de charge entre ADN et bromure d'éthidium.

Comme le montre la **figure n°34**, la seule partie plane susceptible de s'intercaler *in vitro* est le groupement phényle ; le noyau acridine est lui aussi plan, mais possède des substituants qui l'empêchent de se glisser au sein de la molécule d'ADN *in vitro*.

Ainsi, les liaisons par transfert de charge mises en évidence par l'étude spectrophotométrique pourraient s'établir entre l'azote chargé positivement de la molécule de bromure d'éthidium et les doublets libres d'électrons des bases azotées de la macromolécule d'ADN.

⇒ La délocalisation des électrons au sein de la molécule de **proflavine** fait apparaître une forme mésomère dans laquelle un atome d'azote est chargé positivement et un autre est chargé négativement.

Mésomérie de la proflavine :



Ainsi les doublets électroniques libres de la molécule d'ADN pourraient établir une liaison de type ionique avec l'azote chargé positivement du groupement amine de la proflavine.

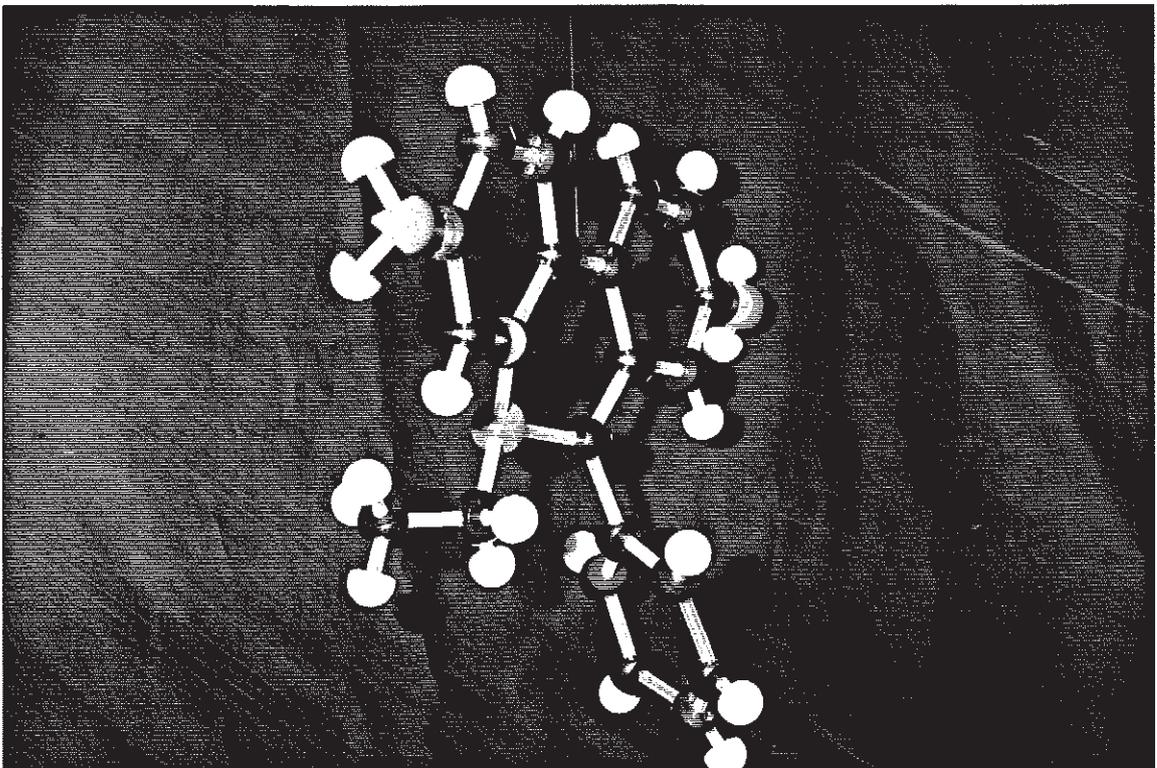
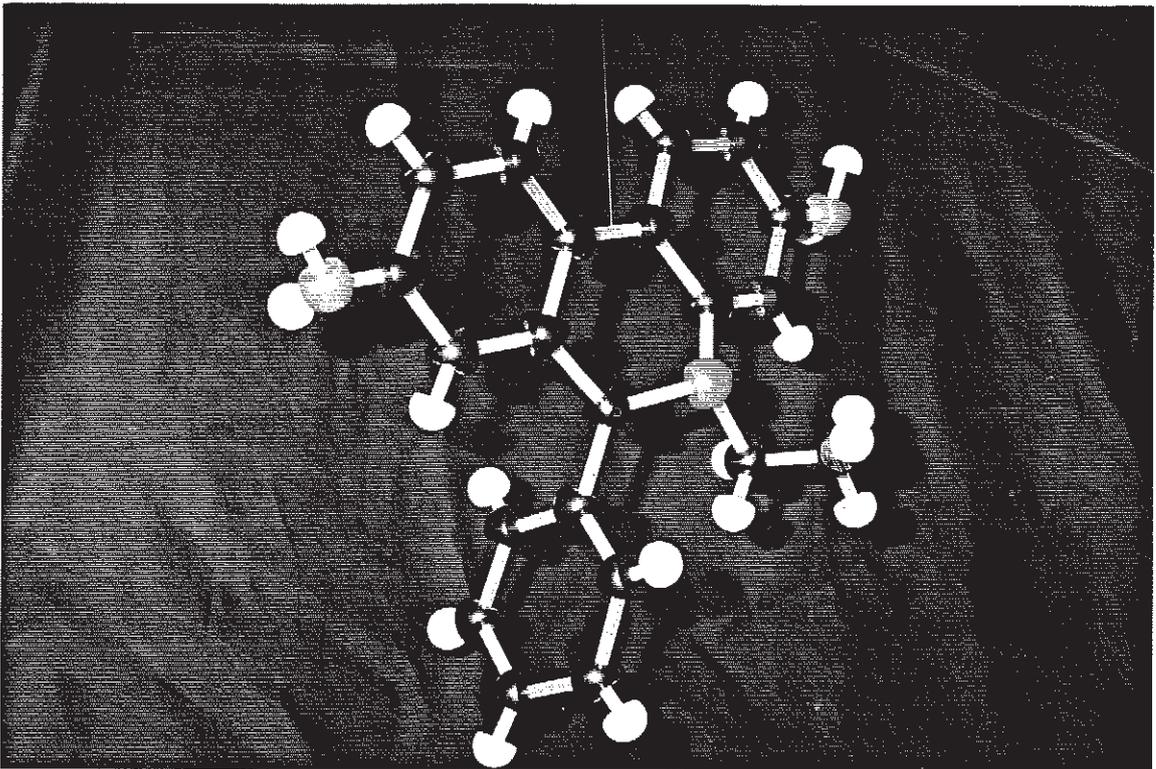
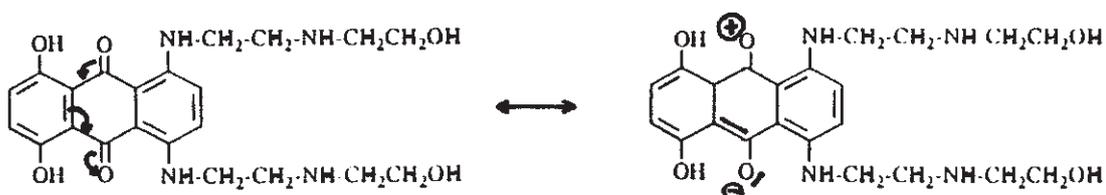


figure n°34 : Bromure d'éthidium : modèle moléculaire.

⇒ La délocalisation des électrons au sein de la molécule de **mitoxantrone** fait apparaître un atome d'oxygène chargé positivement et un atome d'oxygène chargé négativement.

Mésomérie de la mitoxantrone :



Ainsi les doublets électroniques libres de la molécule d'ADN pourraient établir une liaison de type ionique avec l'oxygène chargé positivement de la partie quinonique de la mitoxantrone.

⇒ Il est plus délicat de prévoir la formation de liaisons ioniques entre l'ADN et la **daunomycine** ; en effet, l'étude spectrophotométrique UV n'a pas révélée de bande de transfert de charge du complexe mis en évidence par l'étude spectrophotométrique visible.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au terme de cette étude, nous pouvons admettre que l'étude spectrophotométrique UV - visible constitue un apport précieux dans la connaissance des liaisons ADN - intercalants ADN.

En effet, les expériences réalisées nous permettent d'affirmer qu'un complexe par transfert de charge se forme et que des liaisons différentes des liaisons covalentes peuvent s'établir entre l'ADN et trois des molécules étudiées : le bromure d'éthidium, la proflavine et la mitoxantrone.

Il serait intéressant de compléter cette étude dans plusieurs directions :

- réaliser le même type d'expérimentations en remplaçant l'ADN par des poly (polymères de nucléotides : poly A, poly C, poly T, poly G) synthétiques afin de constater si les liaisons par transfert de charge s'établissent préférentiellement avec les unes ou les autres des bases azotées, les bases puriques ou pyrimidiques ;
- tester l'impact de cette formation de complexe par transfert de charge sur la conservation de l'intégrité de la molécule d'ADN *in vivo* ;
- étudier si ces liaisons ioniques, stables *in vitro*, permettraient à elles seules de stopper le développement d'une population de cellules cancéreuses ; les molécules intercalantes possèderaient alors une double activité anticancéreuse : par le phénomène d'intercalation même et par la formation de complexes par transfert de charge.



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1- **Adler M.A. (d')**. Comment une cellule devient cancéreuse. *Sciences et Avenir*, 1980, **403** : 74-82.
- 2- **Amiel J.L., Rouëssé J., Machover D.** Abrégé de cancérologie. Masson édit., Paris, 1976, 281 p.
- 3- **Andrieu J.M.** Biologie des cancers. Ellipses édit., Paris, 432 p.
- 4- **Blake A., Peacocke A.R.** The interaction of Aminoacridines with Nucleic Acids. *Biopolymers*, 1968, **6** : 1225-1253.
- 5- **Cooper G.M., Lane M.A.** Cellular transforming genes and oncogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, **738** : 9-20.
- 6- **Demaille A., Cappelaere P.** Prévention et diagnostic des cancers. Flammarion Médecine-Sciences édit., Paris, 1989, 342 p.
- 7- **Dulbecco R.** La nature du cancer. *La Recherche*, 1982, **139** : 1426-1436.
- 8- **Elghozi J.L., Duval D.** Aide mémoire de pharmacologie. Flammarion Médecine-Sciences édit., Paris, 1987, 331 p.
- 9- **Ellerton N.F., Isenberg I.** Fluorescence polarization study of DNA-Proflavine complexes. *Biopolymers*, 1969, **8** : 767-786.

- 10- **Follézou J.Y., Pouillard P.** Précis de chimiothérapie anticancéreuse. Doin édit., Paris, 1980, 444 p.
- 11- **Jacquillat Cl., Khayat D., Weil U., Band P.R.** Les cancers : guide clinique, pronostique et thérapeutique. Maloine édit., Paris, 1986, 521 p.
- 12- **Jove R., Hanafusa H.** Cell transformation by the viral src gene. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 1987, **3** : 31-56.
- 13- **Kellie S.** Cellular transformation, tyrosine kinase oncogenes, and the cellular adhesion plaque. *Bio. Essays*, 1988, **8** : 25-30.
- 14- **Kruh J.** Biochimie - Etudes médicales et biologiques. tome I : biologie cellulaire et moléculaire. Hermann édit., Paris, 1982, 253 p.
- 15- **Kruh J.** Biochimie - Etudes médicales et biologiques. tome II : métabolismes. Hermann édit., Paris, 1983, 252 p.
- 16- **Lagorce J.F., Comby F., Buxeraud J., Raby C.** Synthèse et activité antithyroïdienne de dérivés du triazole. *Eur. J. Med. Chem.*, 1992, **27** : 359-368.
- 17- **Lagorce J.F., Moulard T., Raby C.** Synthesis and inhibitory effects of 1,2,4-triazole derivatives on platelet aggregation. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 1992, **42(I)**, **3** : 314-318.
- 18- **Larra F.** Manuel de cancérologie. Doin édit., Paris, 282 p.
- 19- **Piéri F., Kirkiacharian S.** Pharmacologie et thérapeutique. Ellipses édit., Paris, 1992, 463p.

- 20- **Plumbridge T.W., Brown J.R.** Spectrophotometric and fluorescence polarization studies of the binding of Ethidium, Daunomycin and Mepacrine to DNA and to Poly(I.C). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1977, **479** : 441-449.
- 21- **Plumbridge T.W., Brown J.R.** The intercalation of Adriamycin and Adriamycin analogues with nucleic acids in the B and A conformations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1979, **563** : 181-192.
- 22- **Plumbridge T.W., Knight V., Patel K.L., Brown J.R.** Mechanism of DNA-binding of some aminoalkylamino-derivatives of anthraquinone and naphthacenequinone. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1980, **32** : 78-80.
- 23- **Rapp F.** What is the potential role of DNA virus in human cancer ? *Bio. Essays*, 1984, **4** : 400-402.
- 24- **Tubiana M.** Les données nouvelles sur la cancérogénèse. *Act. Pharm. Biol. Clin.*, 1984, **3** : 13-20.
- 25- **Waring M.J.** Complex formation between Ethidium Bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.*, 1965, **13** : 269-282.
- 26- **Waring M.J.** Structural requirements for the binding of Ethidium to nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1966, **114** : 234-244.



TABLE DES MATIERES

PLAN	5
INTRODUCTION	8
1. PREMIERE PARTIE : LE CANCER	10
1.1 INTRODUCTION	10
1.2 DEFINITION	10
1.3 LA CELLULE CANCEREUSE	11
1.3.1 <i>Origine</i>	11
1.3.1.1 Introduction	11
1.3.1.2 Les étapes de la cancérisation	11
1.3.1.2.1 La phase infra-clinique	12
1.3.1.2.2 La phase clinique	12
1.3.2 <i>Caractéristiques des cellules cancéreuses</i>	13
1.3.2.1 Morphologie.....	13
1.3.2.2 Différences entre la cellule cancéreuse et la cellule normale	14
1.3.2.3 Biochimie des cellules cancéreuses.....	15
1.3.2.3.1 Echappement aux mécanismes normaux de contrôle de la croissance.	16
1.3.2.3.2 Modifications métaboliques.....	16
1.4 CLASSIFICATIONS DES CANCERS	16
1.4.1 <i>La classification TNM</i>	17
1.4.2 <i>Classification anatomopathologique</i>	18
1.4.2.1 Les tumeurs solides	18
1.4.2.1.1 Carcinomes (épithéliomas)	18
1.4.2.1.2 Sarcomes.....	19
1.4.2.1.3 Tumeurs à structure neuroectoblastique.....	19
1.4.2.1.4 Tumeurs de structure embryonnaire, uni- ou pluritissulaires	19
1.4.2.1.5 Tumeurs de structure composite, uni- ou pluritissulaires	20
1.4.2.2 Cancres des organes hématopoïétiques.....	20
1.4.2.2.1 Les lymphomes malins	20
1.4.2.2.2 Les leucémies.....	22
1.5 LES FACTEURS DE LA CANCERISATION	24
1.5.1 <i>Facteurs de risque endogènes ou propres à l'homme</i>	24
1.5.1.1 Facteurs génétiques	24
1.5.1.2 Facteurs hormonaux	25
1.5.1.3 Facteurs immunologiques	26
1.5.1.4 Autres facteurs endogènes	26
1.5.2 <i>Facteurs de risque exogènes ou extérieurs à l'homme</i>	27
1.5.2.1 Carcinogènes chimiques	27
1.5.2.1.1 Les cancérogènes directs.....	27
1.5.2.1.2 Les procancérogènes.....	28
1.5.2.2 Carcinogènes physiques	32
1.5.2.2.1 Rayonnements ionisants	32
1.5.2.2.2 Radiations ultraviolettes	33
1.5.2.3 Les virus	33
1.5.2.3.1 Virus à ADN	33
1.5.2.3.2 Virus à ARN	34

2. DEUXIEME PARTIE : LES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX	36
2.1 LE CYCLE CELLULAIRE	36
2.2 LES MEDICAMENTS ANTICANCEREUX	38
2.2.1 Médicaments anticancéreux et cycle cellulaire	38
2.2.2 Mécanisme d'action des anticancéreux	39
2.2.2.1 Les antimétabolites.....	40
2.2.2.1.1 Antimétabolites des bases puriques	40
2.2.2.1.2 Analogues des bases pyrimidiques	42
2.2.2.1.3 Analogues de l'acide folique	42
2.2.2.2 Substances agissant sur la structure de l'ADN	43
2.2.2.2.1 Les alkylants	43
2.2.2.2.2 Les scindants	46
2.2.2.2.3 Les intercalants	46
2.2.2.3 Composés agissant sur des fonctions cellulaires	48
2.2.2.3.1 Inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline	48
2.2.2.3.2 L-asparaginase = KIDROLASE*	49
2.2.2.4 Hormones et antihormones	51
2.2.2.4.1 Hormones	51
2.2.2.4.2 Les antihormones	53
2.2.2.4.3 Les analogues de la LH-RH	53
2.2.2.5 Autres dérivés utilisés en chimiothérapie anticancéreuse.....	55
3. TROISIEME PARTIE : MISE EN EVIDENCE DE COMPLEXES PAR TRANSFERT DE CHARGE ENTRE ADN ET INTERCALANTS ADN.....	57
3.1 INTRODUCTION	57
3.2 METHODOLOGIE.....	57
3.2.1 Etude de l'ADN.....	58
3.2.1.1 Définition :	58
3.2.1.2 Structure :	58
3.2.1.3 La réplication de l'ADN :	60
3.2.1.4 Propriétés de l'ADN :	61
3.2.2 Les substances anticancéreuses utilisées.....	63
3.2.2.1 Le bromure d'éthidium.....	64
3.2.2.2 La daunomycine	64
3.2.2.3 La proflavine	65
3.2.2.4 La mitoxantrone	66
3.2.3 Méthode de détection	66
3.2.3.1 Introduction	66
3.2.3.2 Matériel utilisé.....	67
3.2.4 Protocole expérimental	68
3.2.4.1 Tampon utilisé	70
3.2.4.2 Spectres visibles	70
3.2.4.3 Spectres UV	71
3.3 RESULTATS.....	72
3.3.1 Etude de quatre substances	72
3.3.1.1 Le bromure d'éthidium	72
3.3.1.2 La daunomycine	76
3.3.1.3 La proflavine	80
3.3.1.4 La mitoxantrone	83
3.3.2 Discussion.....	89
CONCLUSION.....	95
BIBLIOGRAPHIE.....	97



RIVOIRE (Emmanuelle) - Apport de l'étude spectrophotométrique dans la connaissance des liaisons ADN-intercalants ADN : approche de la formation d'un complexe par transfert de charge entre ADN et intercalants ADN. - 102 f ; 32 ill ; 30 cm (Thèse : Pharm. ; Limoges; 1994).

RESUME :

L'activité anticancéreuse des intercalants ADN résulte de leur aptitude à s'intercaler entre les paires de bases puriques et pyrimidiques lors de la réplication de l'ADN, phase prémitotique de toute cellule capable de se diviser.

Des études spectrophotométriques UV-visible menées *in vitro*, avec de l'ADN lyophilisé et des molécules intercalantes à caractère électrophile, montrent que, dans ces conditions, il semble s'établir, entre l'ADN et les intercalants ADN, des liaisons différentes de celles connues jusque-là : les liaisons covalentes.

L'obtention d'un point isobestique en spectrophotométrie visible et d'une bande de transfert de charge (BTC) en spectrophotométrie UV amène à émettre l'hypothèse de l'établissement d'une liaison ionique dans les conditions d'expérimentation.

MOTS-CLES :

- Cancer
- ADN
- Point isobestique
- Bande de transfert de charge
- Bromure d'éthidium
- Daunomycine
- Proflavine
- Mitoxantrone.

JURY :

Monsieur J. F. LAGORCE, Maître de conférences
Madame D. DENIS, Pharmacien
Monsieur J. FATIMI, A.T.E.R.

Président
Juge
Juge