



HAL
open science

Etude de la toxicité cardiaque des médicaments anti-cancéreux

Carole Richard

► **To cite this version:**

Carole Richard. Etude de la toxicité cardiaque des médicaments anti-cancéreux. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOMU03 . tel-00938753

HAL Id: tel-00938753

<https://theses.hal.science/tel-00938753>

Submitted on 29 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
FACULTES DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE DIJON
7 BOULEVARD JEANNE D'ARC 21033 DIJON CEDEX

ANNEE 2011

**Etude de la toxicité cardiaque des médicaments
anti-cancéreux**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 16/12/2011

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

PAR

Carole RICHARD

Spécialité : Physiopathologie CardioVasculaire

Co-Directeur de Thèse :

Luc ROCHETTE, Professeur

Catherine VERGELY-VANDRIESSE, Professeur

Jury:

Président du Jury : Christophe PIOT, Professeur

Rapporteur : Karl ISAAZ, Professeur

Rapporteur : Christophe RIBUOT, Professeur

Examineur : Diane RIBUOT, Professeur

Examineur : Marianne ZELLER, Docteur

Examineur : Bruno COUDERT, Docteur

Examineur : Yves COTTIN, Professeur

Examineur : Luc ROCHETTE, Professeur

A notre maître et directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Luc ROCHETTE,

Encore tous mes remerciements pour m'avoir épaulée au cours de ces premiers travaux de recherche, pour m'avoir m'accueillie à bras ouverts au LPPCE et permis par ce biais de faire la connaissance de personnes formidables. Apprendre à vos côtés fut et reste un véritable jeu de l'esprit, le cerveau comme le cœur apparaît comme un muscle qu'il faut faire travailler pour en tirer le meilleur.

A notre maître et co-directeur de thèse,

Madame le Professeur Catherine VERGELY-VANDRIESSE

Tu m'as fait un très beau cadeau en m'apprenant les fondements du travail en laboratoire de recherche: rigueur, précision et persévérance. Ta disponibilité et ta patience m'ont été d'une aide précieuse pour la réalisation des différentes manipulations et ont grandement participé à l'élaboration de ce travail.

A notre juge et rapporteur, Monsieur le Professeur Karl ISAAZ,

Je vous dois énormément. La cardiologie m'aurait probablement moins attirée si je l'avais connue sans votre enthousiasme auprès des patients, votre attention auprès des étudiants, votre vision de travail en équipe et votre application en salle de coronarographie. Votre participation à mon jury de thèse est donc un très grand honneur. Encore merci à vous et à toute l'équipe de cardiologie stéphanoise.

A notre juge et rapporteur, Monsieur le Professeur Christophe RIBUOT,

Beaucoup de dynamisme, de réflexion et d'échanges. Cette semaine de Master à Grenoble ne m'a laissé que de bons souvenirs. Je suis très honorée que vous ayez accepté de consacrer du temps à la lecture de ce travail. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

A notre juge, Madame le Professeur Diane RIBUOT,

Je vous suis très reconnaissante de me faire l'honneur d'être juge de ce travail scientifique. Soyez assurée de mon profond respect et de toute mon estime.

A notre juge, Madame le Docteur Marianne ZELLER,

Ton investissement dans ce travail a été primordial. Ta rigueur et ta minutie ont permis d'éviter de nombreux écueils. Je te fais part de toute ma gratitude pour ta disponibilité, tes

connaissances et ton expérience qui m'ont aidée dans de très nombreuses circonstances.

A notre juge, Monsieur le Docteur Bruno COUDERT,

Votre collaboration a été indispensable dans l'élaboration de ce travail. Elle souligne l'importance d'un travail pluridisciplinaire. Vos connaissances ont permis de préciser et d'étoffer ce manuscrit. Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à ce jury. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

A notre juge, Monsieur le Professeur Christophe PIOT,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous suis extrêmement reconnaissante pour votre disponibilité et votre enthousiasme pour participer à l'évaluation de ce manuscrit. Soyez assuré de ma gratitude et mon profond respect.

A notre juge, Monsieur le Professeur Yves COTTIN,

Dans la continuité du Professeur ISSAZ, tu as su me montrer l'importance de l'investissement au travail et tout l'épanouissement professionnel mais aussi personnel que l'on pouvait en tirer. Ton implication dans ce travail mais aussi dans ma formation a été essentielle. Je te remercie pour tout le temps et l'énergie que tu y as consacrés.

Un immense remerciement à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail par leurs conseils, leur expérience, leurs connaissances et surtout leur soutien.

Sommaire

I. INTRODUCTION

I.1.- LE CANCER ET LA CANCEROGENESE

I.1 – 1. Les oncogènes

I.1 – 2. Les anti-oncogènes

I.1 – 3. La cancérogenèse

I.1 – 4. Le maintien de l'intégrité de l'ADN

I.1 – 5. Les agents cancérigènes

I.1 – 6. Les 3 étapes de l'oncogenèse

I.2.- LES TRAITEMENTS ANTICANCEREUX

I.2 – 1. La chirurgie carcinologique

I.2 – 1.a. Généralités

I.2 – 1.b. La chirurgie curative

I.2 – 1.c. Les autres chirurgies

I.2 – 2. La radiothérapie

I.2 – 2.a. Généralités

I.2 – 2.b. Effets biologiques et radiosensibilité

I.2 – 2.c. Les différents types de radiothérapies

I.2 – 2.d. Progrès en radiothérapie

I.2 – 1.e. La « radiobiologie »

I.2 – 3. La chimiothérapie

I.2 – 3.a. Généralités

I.2 – 3.b. Les antimétabolites

I.2 – 3.c. Les agents alkylants

I.2 – 3.d. Les modificateurs de l'ADN

I.2 – 3.e. Les poisons du fuseau

I.2 – 3.f. Les taxanes

I.2 – 3.g. Les différents types de chimiothérapie.

I.2 – 3.h. Polychimiothérapie et phénomènes de résistance

I.2 – 4. L'hormonothérapie

I.2 – 4.a. Généralités

I.2 – 4.b. Les récepteurs hormonaux

I.2 – 4.c. Œstrogènes et cancer du sein

I.2 – 4.d. Les anti-œstrogènes

I.2 – 4.e. Les anti-aromatases

I.2 – 4.f. Autres traitements hormonaux

I.2 – 5. Les nouveaux traitements anticancéreux

I.2 – 5.a. L'immunothérapie

I.2 – 5.b. Les thérapies ciblées

I. 3.- LA CARDIOTOXICITE DES TRAITEMENTS ANTICANCEREUX

3 – 1. La cardiotoxicité de la radiothérapie

I. 3 – 1.a. Généralités

I. 3 – 1.b. Atteintes péricardiques

I. 3 – 1.c. Atteintes myocardiques

I. 3 – 1.d. Atteintes du tissu conducteur

I. 3 – 1.e. Atteintes coronariennes

I. 3 – 1.f. Atteintes valvulaires

I.3 – 2. La cardiotoxicité de la chimiothérapie

I.3 – 2.a. Cardiotoxicité des Anthracyclines

I.3 – 2.b. Cardiotoxicité des antimétabolites

I.3 – 2.c. Cardiotoxicité des agents alkylants

I.3 – 2.d. Cardiotoxicité des taxanes

I.3 – 3. La cardiotoxicité de l'hormonothérapie

I.3 – 3.a. Cardiotoxicité du Tamoxifène

I.3 – 3.b. Cardiotoxicité des anti-aromatases

I.3 – 4. La cardiotoxicité des nouveaux traitements anticancéreux

I.3 – 4.a. Cardiotoxicité du Trastuzumab

I.3 – 4.b. Cardiotoxicité de l'immunothérapie

I.3 – 4.c. Cardiotoxicité des anti-tyrosine kinases

I.3 – 4.d. Cardiotoxicité des traitements anti-angiogéniques

I.4.- ROLE ET PREVENTION DU STRESS OXYDANT DANS LA CARDIOTOXICITE DES ANTHRACYCLINES

**I. 4– 1. Place du stress oxydant dans la cardiotoxicité des
Anthracyclines**

I.4 – 2. Prévention de la cardiotoxicité des Anthracyclines

I.4 – 2.a. Chronologie d'administration

I.4 – 2.b. Nouvelles Anthracyclines et formes galéniques

I.4 – 2.c. Protection pharmacologique

I. 5.- OBJECTIFS

II. APPROCHES EXPERIMENTALES

II.1.- EFFECTS OF ANGIOTENSIN-1 CONVERTING ENZYME INHIBITION ON OXIDATIVE STRESS AND BRADYKININ RECEPTOR EXPRESSION DURING DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY IN RATS

II.2.- GENERAL OXIDATIVE STRESS DURING DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY IN RATS: ABSENCE OF CARDIOPROTECTION AND LOW ANTIOXIDANT EFFICENCY OF ALPHA-LIPOIC ACID

II.3.- OXIDATIVE STRESS AND MYOCARDIAL GENE ALTERATIONS ASSOCIATED WITH DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY IN RATS PERSIST FOR TWO MONTHS AFTER TREATMENT CESSATION

III. APPROCHE CLINIQUE

III.1.- CHARACTERISTICS AND IN-HOSPITAL OUTCOMES OF WOMEN WITH A HISTORY OF BREAST CANCER AND ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION. DATA FROM THE RICO SURVEY

IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

V. BIBLIOGRAPHIE

I.
INTRODUCTION

I.1.- Cancer et cancérogenèse

Il n'existe pas de définition simple du mot cancer. Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication. De plus, ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant en le détruisant puis de migrer à distance pour former des métastases.

I.1 – 1. Les oncogènes

Le mot cancer est d'origine latine et sa première description remonte à l'Égypte ancienne (papyrus d'Ebers) [1]. Ce n'est qu'au début du XX^e siècle que les mécanismes moléculaires de la carcinogénèse ont commencé à être connus. L'activation de proto-oncogènes cellulaires en oncogènes a été le 1^{er} mécanisme de l'oncogénèse identifié chez l'homme [2]. A l'échelle moléculaire, il existe dans une cellule saine, des proto-oncogènes qui, à la suite d'une mutation, vont devenir des oncogènes impliqués dans des fonctions du cycle et de la division cellulaires. Les oncogènes sont, par définition, des gènes dont l'expression anormale va conduire à l'acquisition d'un phénotype tumoral par une cellule eucaryote normale. Par extension, tous les gènes susceptibles de devenir par la suite de modifications qualitatives ou quantitatives des gènes transformants sont des oncogènes [3]. L'étude des mécanismes de la cancérogenèse débute en 1911 quand Peyton Rous émet l'hypothèse de l'existence de virus oncogènes capables de s'intégrer dans le génome cellulaire, d'en détourner ses mécanismes de synthèse et de conduire au développement de cancers viro-induits (prix Nobel de 1966) [4, 5]. En 1963, Renato Dulbecco démontre que l'adjonction de DNA viral permet à elle seule de transformer des cellules saines en cellules cancéreuses. La découverte de la transcriptase reverse, en 1970 par Temin et Baltimore, permet de comprendre l'intégration de ces virus à l'ARN dans le génome humain. La découverte des proto-oncogènes humains résulte de leur homologie de structure avec ces oncogènes rétroviraux. Ainsi, en 1978, Bishop reconnaît dans le génome de tous les vertébrés une séquence ayant des propriétés oncogéniques. Ces oncogènes ne sont régulés par aucune voie de signalisation et peuvent participer en permanence à la cancérogenèse. Selon leur origine, on distingue des oncogènes viraux (V. oncogène) et des oncogènes cellulaires (C. oncogène ou proto-oncogène). L'activation d'un proto-oncogène en oncogène peut résulter de différents mécanismes quantitatifs ou qualitatifs

comme une mutation ponctuelle, une délétion, une amplification génique, une dérégulation de l'expression génique ou un réarrangement structural. Les proto-oncogènes codent pour des protéines qui interviennent normalement dans toutes les étapes de transduction de signaux extracellulaires de la membrane au noyau et plus spécifiquement dans la division cellulaire et la différenciation. Ces oncoprotéines sont classées en fonction de leur compartimentation cellulaire. Six classes sont ainsi définies : les facteurs de croissance, les récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance, les G protéines ou protéines membranaires liant le GTP, les tyrosines protéines kinases membranaires, les protéines kinases cytosoliques, les protéines à activité nucléaire. Il existe, par ailleurs, des ARN non codants appelés micro-ARN dont la mutation ou les anomalies d'expression peuvent participer elles aussi à l'initiation d'un cancer [6].

I.1 – 2. Les anti-oncogènes

Parallèlement, des anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs sont présents dans les cellules. Leur existence a été évoquée pour la 1^{ère} fois en 1969. Ces gènes sont capables d'inhiber la croissance cellulaire en régulant négativement le cycle cellulaire ou en déclenchant l'apoptose cellulaire. L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus hautement régulé qui aboutit à la destruction cellulaire de façon parfaitement organisée et sans inflammation. Les stimuli capables d'induire l'apoptose sont multiples : disparition d'un facteur protéique, saturation d'un récepteur par un effecteur, irradiation externe à faible dose... Les mutations d'un gène intervenant dans l'apoptose cellulaire jouent un rôle très important dans la cancérogenèse. Cela conduit à l'altération de leurs fonctions. Ces mutations peuvent consister en une mutation ponctuelle, une délétion, une insertion ou une anomalie de la méthylation de promoteur inhibant la transcription.

I.1 – 3. La cancérogenèse

Dans de nombreux processus tumorigènes, on retrouve la surexpression d'un oncogène doublée d'une non-expression d'anti-oncogène. Il faut cependant souligner que l'activation anormale du cycle cellulaire par un oncogène nécessite l'altération d'un seul allèle alors que la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur nécessite l'altération des 2 allèles. Le mode d'action des proto-oncogènes est donc considéré comme dominant contrairement à celui des gènes suppresseurs de tumeurs qui est récessif [2]. Deux étapes successives sont

nécessaires pour la perte d'activité des gènes suppresseurs de tumeurs. La 1^{ère} étape peut-être somatique (cancer sporadique) ou germinale (cancer héréditaire). Si la 1^{ère} étape est de type germinal, le gène agit alors comme un facteur de prédisposition à un cancer héréditaire. Ce type de cancer résulte d'une anomalie moléculaire identique à celle des formes sporadiques mais présente dans les gamètes et donc dans toutes les cellules de l'organisme, on parle d'altération germinale de l'ADN. Que la 1^{ère} étape soit somatique ou germinale, l'atteinte du second allèle est somatique et peut aboutir à l'émergence d'un clone de cellules transformées. Les cancers héréditaires se transmettent selon un mode autosomique dominant et représentent 1 à 5% de l'ensemble des cancers. A l'opposé, les cancers sporadiques résultent d'anomalies moléculaires restreintes aux cellules tumorales.

I.1 – 4. Le maintien de l'intégrité de l'ADN

Afin d'assurer le fonctionnement normal de chacune des cellules, il est nécessaire que la structure de l'ADN soit stable. Deux mécanismes permettent le maintien de l'intégrité du génome: la mort des cellules mutantes par apoptose comme vu précédemment et la réparation des lésions de l'ADN. Le 3^{ème} mécanisme possible à l'origine de la cancérogénèse, en dehors de l'activation de proto-oncogènes et l'inactivation des gènes oncosuppresseurs, est donc l'inactivation de gènes de réparation de l'ADN. L'ADN d'une cellule subit toutes les heures jusqu'à 10000 lésions provoquées essentiellement par des réactions d'hydrolyse, d'oxydation, de méthylation non enzymatiques ou encore des erreurs de réplication conduisant à une instabilité génétique. Des systèmes de détection cheminent le long de l'ADN et activent des mécanismes de signalisation quand ils détectent des erreurs. Les signaux générés vont arrêter la progression des cellules dans le cycle cellulaire et stimuler des systèmes de réparation [7]. Deux systèmes de réparation existent: le *mismatch repair* ou système de réparation de mésappariements apparus suite à des erreurs de la réplication et le *nucleotide excision repair* (NER) ou système excision-resynthèse lorsqu'il s'agit de mutations induites par des carcinogènes environnementaux. Un tiers des gènes d'une cellule est consacré à cette protection. A noter que l'altération des gènes réparateurs de l'ADN n'initie pas le processus de l'oncogénèse mais permet la persistance d'altération des gènes contrôlant le cycle cellulaire ou l'apoptose.

En plus des systèmes de réparation de l'ADN, il existe des gènes inductibles qui vont conduire à la formation de molécules anti-oxydantes ou d'enzymes détruisant les agents d'oxydation responsables d'altérations du génome. Tous les individus n'ont pas les mêmes

capacités de détoxification car l'expression de ces gènes est très variable d'un individu à un autre. Ce polymorphisme pharmacogénétique conduit à des différences de risque individuel dans le développement d'un cancer [8].

Associés aux systèmes de réparation de l'ADN et de détoxification cellulaire, il existe une surveillance immunitaire. Ainsi, dans certaines circonstances, on assiste à la formation d'anticorps contre des formes mutées de protéines cellulaires permettant de se protéger contre le développement de différents cancers [9]. On comprend donc mieux que l'incidence des cancers soit plus élevée chez les patients immunodéprimés et par là même chez les personnes âgées [2, 10].

Malgré tous ces systèmes visant à maintenir l'intégrité du génome humain, certaines cellules tumorales sécrètent des agents qui les leurrent et qui au lieu d'éliminer les cellules cancéreuses, collaborent avec elles.

I.1 – 5. Les agents cancérigènes

Des gènes impliqués dans le métabolisme des agents carcinogènes interviennent aussi dans le développement d'un cancer. En effet, la grande majorité des carcinogènes requiert des transformations métaboliques qui sont génétiquement contrôlées pour devenir actifs. Cela nécessite une activation par les cytochromes P450 puis une étape de conjugaison avec un sulfate, un glucuronate ou un glutathion. Ces agents cancérigènes peuvent alors exercer leur action qui sera d'autant plus facilement qu'il existe déjà la mutation d'un oncogène ou d'un anti-oncogène, un gène de prédisposition au cancer ou une maladie de réparation de l'ADN. La découverte de l'existence d'agents cancérigènes extrinsèques par Sir Percival Port remonte à la deuxième moitié du XVIII^e. Fin XIX^e, l'importance de la dose et de la nature de ces agents est reconnue, avec comme corolaire l'existence d'un délai entre l'exposition à ces agents et l'apparition du cancer. Concernant les agents cancérigènes, il convient de différencier les agents chimiques génotoxiques qui provoquent des altérations géniques et ceux non génotoxiques dont le mécanisme d'action passe par la prolifération cellulaire réparatrice qu'ils induisent par leur cytotoxicité [8]. Ainsi en augmentant la prolifération cellulaire, ils augmentent la probabilité qu'une lésion dans l'ADN apparaisse. On parle de composés promoteurs qui n'interagissent pas eux-mêmes avec l'ADN et dont le rôle est primordial s'il y a un défaut d'apoptose. On comprend alors mieux l'effet d'hormesis qui correspond à une diminution de l'effet cancérigène de ces agents quand on diminue leur dose ou leur durée d'exposition. A noter que certains cancérigènes tels que le tabac et les rayons

ultra-violet ou X sont des cancérigènes complets puisqu'ils sont à la fois génotoxiques et promoteurs. Tous les agents cancérigènes induisent un déséquilibre entre oncogènes et anti-oncogènes ce qui constitue la base du développement d'un cancer.

A la suite de l'altération du génome par un agent cancérigène, il existe 4 possibilités [2]:

- l'ADN peut-être réparé fidèlement.
- la cellule mutante peut-être éliminée.
- la lésion peut persister malgré les systèmes de réparation.
- les systèmes de réparation créent une réparation fautive.

La fréquence respective de ces 4 issues est dépendante de la nature et du nombre des lésions.

I.1 – 2. Les 3 étapes de l'oncogenèse

L'oncogenèse résulte de l'accumulation dans une cellule d'évènements génétiques et épigénétiques, un seul de ces évènements n'est pas suffisant pour convertir une cellule normale en cellule maligne [2, 8]. Les évènements épigénétiques n'entraînent pas d'altération de la séquence informative du matériel génétique mais peuvent participer, par exemple, à l'immortalisation de la cellule mère de la tumeur, à la suppression de l'inhibition de contact des cellules, à l'acquisition des propriétés d'angiogenèse, d'invasion des tissus voisins et de migration. En 1951, Berenblum décrit le concept de cancérogénèse en 2 étapes: une phase d'initiation et une phase de promotion ou progression tumorale [2]. Il semblerait cependant que la promotion et la progression tumorale soient 2 phases distinctes ce qui conduit à diviser la cancérogénèse en 3 temps (schéma 1): l'initiation qui correspond à l'apparition d'une lésion rapide et irréversible de l'ADN secondaire à l'exposition à un carcinogène, la promotion due à l'exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée et la phase de progression secondaire à l'acquisition de propriétés de multiplication non contrôlée, d'indépendance, de perte différenciation et d'invasion locale puis métastatique [11-13]. Les modifications génomiques retrouvées lors des phases d'initiation et de promotion ne sont pas capables à elles seules de générer un cancer. La maladie cancéreuse résulte d'une perturbation généralement acquise et transmissible des mécanismes de contrôle de la prolifération: phases d'initiation et de promotion, mais aussi de la position des cellules: phase de progression. La caractéristique majeure de la cellule cancéreuse est de proliférer sans les contraintes fixées par l'homéostasie qui imposent normalement l'arrêt de la prolifération.

Les caractéristiques phénotypiques de cette cellule sont les suivantes [14, 15]:

- perte de l'inhibition de contact.

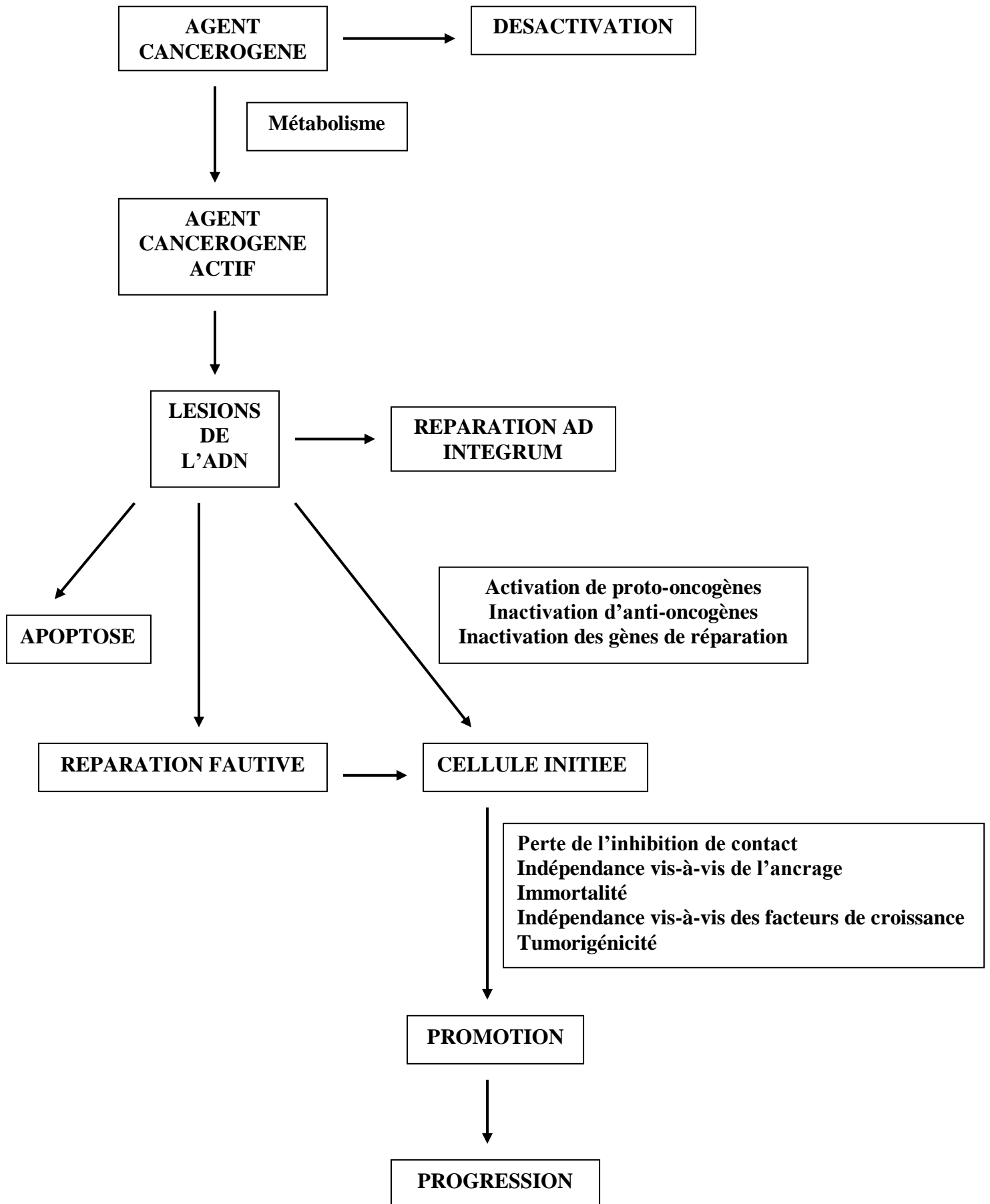
- perte de la dépendance vis-à-vis de l'ancrage.
- indépendance par rapport aux facteurs de croissance.
- immortalité.
- tumorigénicité.

Au cours de la progression tumorale, du fait d'une prolifération cellulaire plus importante, on assiste à une augmentation de l'instabilité génétique. Lors de cette prolifération cellulaire anormale, on assiste dans certains cas à la dédifférenciation ou au rajeunissement des cellules néoplasiques. Les principaux marqueurs de dédifférenciation cellulaire sont les suivants:

- présence de noyaux de taille anormale (anisocaryose).
- présence de mitoses nombreuses et anormales.
- présence de cellules de taille irrégulière (anisocytose).
- disparition des caractères spécifiques des cellules normales comme les récepteurs hormonaux.
- multiplication et empilement des couches cellulaires.
- disparition de l'architecture tissulaire normale telle que l'alignement des épithéliums ou la constitution de tubes glandulaires.

Pour survivre et proliférer, la tumeur doit être capable de stimuler l'angiogenèse. La prolifération de ces cellules mésenchymateuses normales aboutit à la « stroma réaction » qui permet le développement ultérieur du cancer. Parfois cette angiogenèse n'est pas suffisante et des plages de nécrose voire de calcifications vont se former au centre de la tumeur. Plus une tumeur est vascularisée moins bon est le pronostic car il existe alors un plus grand risque de diffusion métastatique. De plus, la richesse vasculaire rend l'exérèse de la tumeur difficile. La dissémination des cellules cancéreuses se fait par voie sanguine mais aussi lymphatique. Au niveau lymphatique, quand le 1^{er} relais ganglionnaire est atteint, les cellules cancéreuses peuvent y être détruites, rester quiescentes, s'y multiplier et donner une métastase ganglionnaire palpable, traverser le ganglion et gagner d'autres relais ganglionnaires voire infiltrer tout le trajet des vaisseaux lymphatiques entraînant une lymphangite carcinomateuse. La poursuite de l'invasion, par les cellules cancéreuses, des vaisseaux lymphatiques aboutit à l'envahissement de la circulation générale par le canal thoracique conduisant à la formation de métastases parenchymateuses.

Schéma 1: La cancérogenèse.



I.2.- Les traitements anticancéreux

La prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un cancer est multidisciplinaire. Elle fait appel à différentes spécialités dont les plus connues sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Depuis quelques années, l'arsenal thérapeutique à la disposition du praticien s'est enrichi de l'hormonothérapie, de l'immunothérapie et des thérapies ciblées. Le projet thérapeutique ainsi élaboré est personnalisé et peut-être modulé en fonction de l'évolution tumorale.

I.2 – 1. La chirurgie carcinologique

I.2 – 1.a. Généralités

La chirurgie carcinologique est restée pendant de nombreuses années le seul traitement anticancéreux disponible. Actuellement, elle s'intègre dans un projet thérapeutique. Sa mise en œuvre nécessite une discussion collégiale pluridisciplinaire. Elle doit être planifiée et impose la connaissance au préalable de la nature histologique de la tumeur. Cela nécessite la réalisation de biopsies ou de résections endoscopiques. Il convient, quand la preuve de la nature cancéreuse de la lésion est faite, de réaliser un bilan d'extension afin de discuter de l'opportunité d'un traitement néo-adjuvant. Enfin, il est important de connaître les limites du geste chirurgical qui ne traite pas la maladie micro-métastatique. Cette dernière requiert l'instauration d'un traitement adjuvant comme la chimiothérapie. La chirurgie carcinologique s'intègre donc dans une stratégie thérapeutique même si elle reste, dans plus de 80% des cas, le temps thérapeutique majeur. La résection chirurgicale doit être la plus complète possible et éviter au maximum la diffusion de cellules tumorales dans les tissus avoisinants au cours du geste opératoire. L'examen anatomo-pathologique extemporané apparaît indispensable pour savoir si les marges de résection se trouvent en zone saine.

I.2 – 1.b. La chirurgie curative

La chirurgie carcinologique peut consister en une large exérèse monobloc. L'intérêt de ce type de chirurgie est cependant discuté [16, 17]. En effet, l'extension de certaines tumeurs rend l'acte chirurgical très délabrant. Les suites opératoires sont souvent compliquées or elles conditionnent la rapidité de mise en route d'un éventuel traitement adjuvant. Par ailleurs même si l'exérèse a été extensive, elle ne permet pas de traiter les micro-métastases, d'où le

concept de chirurgie limitée qui est moins radicale mais qui aboutit à des résultats identiques en terme de survie [17-19]. Parfois, si la tumeur est trop extensive, la chirurgie ne consiste qu'en une réduction du volume tumoral avant la mise en route d'un traitement adjuvant.

L'intérêt du curage ganglionnaire ou lymphadénectomie est pronostic. Ce curage s'adresse aux 1^{ers} relais ganglionnaires car au-delà, le cancer est considéré comme métastatique [20, 21]. Il est toujours effectué à partir de la tumeur du fait du caractère généralement successif de l'envahissement des différents relais. Les métastases qui sautent un relais ou « skip métastases » sont rares.

En cas de métastases ou de récurrence de certaines tumeurs après radiothérapie, la chirurgie peut aussi être un moyen thérapeutique curatif. S'il s'agit de métastases, leur exérèse est envisagée si la tumeur primitive a été traitée avec succès, si l'intervalle libre entre le traitement de la tumeur primitive et l'apparition de la métastase est long signant la lenteur d'évolution du processus tumoral ou s'il existe une seule métastase. Dans tous les cas, il est nécessaire que l'acte chirurgical soit facile à réaliser.

I.2 – 1.c. Les autres chirurgies

Malheureusement, dans quelques cas, la chirurgie n'est que palliative. Elle peut alors avoir plusieurs objectifs:

- limiter les douleurs (la neurochirurgie d'interruption par exemple) [22-24].
- lever un obstacle (chirurgie de dérivation) [25].
- améliorer le confort du patient.
- préserver un certain degré d'autonomie.

La chirurgie à visée hormonale réalisée dans le traitement des cancers hormonodépendants : pulpectomie bilatérale dans le cancer de prostate ou encore l'ovariectomie dans le cancer du sein, est de plus en plus abandonnée au profit d'une castration chimique [26].

De nos jours, même si la chirurgie carcinologique est moins délabrante, la chirurgie de reconstruction reste cependant indispensable dans certaines situations [27, 28]. Elle permet aussi bien de réparer les mutilations induites par l'intervention elle-même que de corriger les séquelles des traitements adjuvants en particulier la radiothérapie.

I.2 – 2. La radiothérapie

I.2 – 2.a. Généralités

Trois grandes dates marquent la naissance de la radiothérapie. La découverte, en 1895, des rayons X par W.K. Röntgen, celle de la radioactivité naturelle en 1896 par Becquerel et celle du radium par Marie Curie en 1898 [29]. Il a cependant fallu attendre les années 1950 pour que des méthodes d'irradiation sélectives et précises soient développées grâce à l'avènement des rayonnements de haute énergie. Les rayonnements dits de haute énergie sont ceux dont l'énergie dépasse 1MeV (million électron-volt). Ils sont émis par des appareils de cobalt-60, des béatrons ou des accélérateurs linéaires. Il existe différents types de radiothérapie dont le principe reste cependant toujours le même: utiliser, sur les cellules tumorales, la capacité destructrice des rayonnements ionisants quelque soit leur origine, atomique, nucléaire ou provenant d'accélérateurs de particules. La radiothérapie comme les autres traitements anticancéreux s'inscrit dans un projet thérapeutique, elle apparait cependant quasi incontournable puisqu'elle est programmée dans 2/3 des schémas thérapeutiques. Les protocoles de radiothérapie sont définis principalement en fonction du type de tumeur, de sa localisation, de sa taille, de son extension et de son grade. La dose totale ne suffit pas pour définir un traitement par irradiation, il faut également tenir compte de la dose par fraction, du nombre total de fractions et du nombre de fractions par jour ou par semaine [30]. Elle peut être associée à la chirurgie:

- en préopératoire pour diminuer les risques de greffe néoplasique per-opératoire ou pour rendre opérable de très grosses lésions.

- en postopératoire pour diminuer le risque de récurrence locale voire même en per-opératoire dans le cancer du sein permettant de réduire de 90% les récurrences tumorales observées sans radiothérapie.

Les associations radio-chimiothérapie sont donc fréquentes mais posent le problème de la potentialisation des effets toxiques de chacune, quant à l'adjonction d'une hormonothérapie à une radiothérapie, elle a un effet synergique dans le traitement du cancer de la prostate non retrouvé dans le cancer du sein.

I.2 – 2.b. Radiothérapie externe et curiethérapie

Dans la radiothérapie externe, la source d'irradiation est à l'extérieur du malade. Différents outils vont permettre d'obtenir une téléradiothérapie « conformationnelle » délivrant la dose

maximale dans la tumeur et minimale autour. Pour cela, 4 à 6 orientations de faisceau vont être utilisées avec, pour chacune de ces orientations, l'adaptation de la forme du champ irradié au volume tumoral grâce à des caches.

La curiethérapie dont la source est à l'intérieur de l'organisme comprend la curiethérapie par sources solides scellées, interstitielle, endocavitaire ou encore par sources non scellées liquides. Initialement la curiethérapie ou brachythérapie utilisait du radium. Cette poudre de radium était contenue dans des tubes ou des aiguilles de platine scellés avec soin et de manière étanche. Ces tubes de radium étaient insérés dans les cavités utérines et vaginales pour traiter les cancers du col, et les aiguilles étaient implantées au sein même des tumeurs de la peau ou de la langue. Il était donc indispensable que la tumeur soit accessible et de petite dimension. Secondairement, les aiguilles de radium 226 ont été remplacées par de l'or puis des fils d'iridium-192, de strontium-90 ou de ruthénium-106 améliorant les conditions de traitement. Ces nouvelles sources d'irradiation peuvent là encore être introduites dans les cavités naturelles de l'organisme pendant un temps déterminé mais aussi placées à l'intérieur d'un organe par voie chirurgicale sous contrôle radiographique [31]. La curiethérapie permet ainsi de délivrer une dose importante dans un volume étroit avec une dose satellite réduite au niveau des organes voisins [32, 33]. Cependant, elle ne constitue que rarement un traitement isolé et est fréquemment associée à d'autres thérapeutiques anticancéreuses voire combinée à une irradiation externe.

I.2 – 2.c. Effets biologiques et radiosensibilité

Différents types de radiations ionisantes sont utilisées en thérapeutique:

- des radiations ionisantes non chargées électromagnétiques telles les photons X et les photons gamma dont les caractéristiques sont de ne pas avoir de masse ni de charge et des radiations ionisantes non chargées particulières comme les neutrons.

- des radiations ionisantes chargées comme le rayonnement β^- , les électrons accélérés, le rayonnement α , les protons et les ions légers.

Quand un faisceau de rayonnement ionisant pénètre à l'intérieur d'un tissu, une partie du rayonnement est absorbée, une autre est déviée de sa trajectoire, on parle alors de diffusion et la 3ème est transmise sans interaction. Les radiations électromagnétiques transfèrent leur énergie aux molécules du tissu traversé, il en résulte des ionisations ou des excitations électroniques. En traversant un tissu, ces électrons vont perdre de l'énergie et donc épargner les structures profondes [34].

L'action biologique des rayonnements ionisants est divisée en 3 phases:

- une phase physique qui est de très courte durée (10^{-13} s) [35]. Elle correspond à des ionisations et des excitations moléculaires faisant suite à la traversée du faisceau.

- une phase physico-chimique qui dure quelques secondes à quelques minutes. Pendant cette phase, les molécules ionisées et excitées lors de la phase précédente réagissent entre elles et avec les molécules voisines. On assiste alors à un effet direct sur les macromolécules comme l'ADN et indirect par l'intermédiaire des radicaux libres générés par la radiolyse de l'eau. On comprend ainsi mieux « l'effet oxygène » qui correspond à la plus grande radiosensibilité des cellules en présence d'oxygène du fait de la création de radicaux libres à fort pouvoir oxydant.

- une phase biologique qui apparaît comme la conséquence des radiations ionisantes sur les macromolécules et qui se traduit par une perturbation des principales fonctions cellulaires. On distingue ainsi l'action sur les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Sur les acides nucléiques qui représentent la cible élective, on constate le plus souvent des cassures simple brin mais aussi des cassures simple brin avec gap c'est-à-dire perte d'un sucre et d'une base, des altérations des bases et des cassures double brin [34, 36]. L'altération des protéines conduit à une altération de la perméabilité membranaire, une diminution de la communication intercellulaire et des modifications de la transduction transmembranaire. Au niveau des lipides, on assiste à des peroxydations lipidiques ayant différentes conséquences telle qu'une diminution de la fluidité membranaire.

Cette action sur les différentes structures peut conduire à des lésions létales, non réparables d'emblée, à l'accumulation de lésions sublétales ou à la non réparation de lésions potentiellement létales. Un paramètre simple permet de caractériser la radiosensibilité d'un tissu, il s'agit de la fraction survivante à 2 Gy (SF2). Plus la SF2 est grande, moins la lignée cellulaire est radiosensible. Généralement, moins la cellule est différenciée, plus elle est radiosensible. Pour une même lignée, la radiosensibilité est fonction de différentes caractéristiques cellulaires comme la position des cellules dans le cycle cellulaire, le degré d'oxygénation, le pH, le contenu en ADN, la teneur en glutathion et thiols, l'efficacité des systèmes de réparation des lésions radio-induites mais aussi en fonction de la technique d'irradiation et en particulier la nature du rayonnement, du fractionnement (nombre total de séances) et de l'étalement (durée du traitement) du débit de dose [30, 34, 35]. L'intérêt du fractionnement est multiple. Il permet la réparation des lésions dites sublétales qui deviennent létales en cas d'accumulation, il facilite la repopulation, la réoxygénation du tissu tumoral et la redistribution des cellules en phase G2 connue pour sa grande radiosensibilité. La réparation des tissus sains avoisinants peut s'initier grâce à ce fractionnement et ce beaucoup

plus vite que dans les tissus tumoraux, c'est sur cet effet différentiel entre tissu sain et tumoral qu'est basée la radiothérapie.

I.2 – 2.d. Les différents types de radiothérapies

De manière générale, la radiothérapie peut être curative, elle a alors pour but de détruire définitivement les cellules cancéreuses contenues dans le volume irradié afin d'obtenir une guérison. Cela requiert l'absence de métastases et une dose d'irradiation tumorale inférieure à la dose de tolérance des organes critiques. Toute la tumeur doit être irradiée notamment les prolongements microscopiques dans le tissu sain environnant.

La radiothérapie peut aussi être palliative dans le but de ralentir l'évolution des cancers évolués localement ou les cancers métastatiques [37].

Elle peut aussi être symptomatique pour soulager les douleurs ou lors de compression médullaire ou radiculaire [22-24].

I.2 – 2.e. Progrès en radiothérapie

Dans tous les cas, il est nécessaire de déterminer le volume cible à irradier. Cette détermination se fera en fonction des données du bilan d'imagerie, des connaissances que l'on a de l'histoire naturel de ce cancer, du compte-rendu opératoire s'il y a eu une chirurgie et de l'histologie de la tumeur. Ainsi, différents volumes à irradier ont été définis. Le volume total macroscopique ou GTV correspondant au volume apparent de la tumeur, le volume cible anatomo-clinique ou CTV faisant référence aux extensions habituelles observées sur les pièces d'exérèse chirurgicale et le volume cible prévisionnel qui tient compte des imperfections des faisceaux et des mouvements du malade [33]. Actuellement, le but est de focaliser la dose d'irradiation sur le volume à traiter pour augmenter la dose d'irradiation tout en diminuant la toxicité au niveau des zones saines [38]. Les efforts afin d'optimiser l'effet des rayonnements ionisants portent en 1^{er} lieu sur une meilleure acquisition des données anatomiques de la tumeur grâce à l'immobilisation du patient, l'utilisation de systèmes d'imagerie plus performants comme les coupes jointives du scanner permettant une reconstruction 3D du volume à irradier (radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle), l'IRM, le PET scan et la prise en compte du mouvement des organes cibles lors de la respiration par exemple [32, 38]. Actuellement, la tomодensitométrie est la technique d'imagerie de référence mais la place de l'IRM, de la tomoscintigraphie, de la tomographie par émission de positron et prochainement de la spectroscopie IRM ou IRM fonctionnelle va se développer [39]. L'étude des mouvements respiratoires a toujours été essentielle pour la

radiothérapie thoracique et abdominale. Du fait de la miniaturisation des champs d'irradiation, il est devenu indispensable d'évaluer très précisément le mouvement des organes en fonction de la respiration. Le concept de « gating » respiratoire est alors né. Il vise à contrôler les mouvements respiratoires et délivrer l'irradiation à un moment précis, planifié à l'avance. Une autre des difficultés de la radiothérapie réside dans la qualité de la mise en place quotidienne des patients sur la table. Grâce à l'obtention d'une imagerie de contrôle embarquée par l'installation d'un système de détection électronique sur l'accélérateur, de gros progrès ont été fait sur le positionnement du malade. Ce système permet par ailleurs de suivre en temps réel le mouvement des repères et du volume cible (« tracking »). L'amélioration des techniques de stimulation, l'augmentation du nombre de champs d'irradiation, l'utilisation de caches multi-lames, les variations d'intensité, le développement de nouveaux modèles de calcul et de distribution de doses contribuent à une meilleure définition des faisceaux et par là même une amélioration des techniques de radiothérapie. La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité permet l'obtention d'une distribution de dose parfaitement adaptée au volume cible [31, 39, 40]. D'autres principes de radiothérapie se développent comme la radiothérapie stéréotaxique qui correspond à une radiothérapie de haute précision par de fins faisceaux de photons ou de protons qui convergent au centre de la lésion. La radiothérapie hélicoïdale ou tomothérapie permet de délivrer la dose d'irradiation sur 360° autour du patient [41]. Elle regroupe dans seul appareil un système d'irradiation conformationnelle avec modulation d'intensité et un dispositif intégré de contrôle scannographique des champs d'irradiation. Le Cyber-Knife, quant à lui, comprend un accélérateur miniaturisé qui est monté sur un bras robotisé, guidé en temps réel par un système d'imagerie basé sur des tubes de rayons X disposés en position fixe dans la salle de traitement [42]. Il correspond à une véritable radiochirurgie du fait des doses de rayons élevées que le robot délivre aux sites choisis [31]. Il offre la possibilité d'orienter un faisceau de photons d'énergie intermédiaire dans toutes les directions possibles. Il corrige les déplacements de la tumeur et les mouvements du patient tout au long du traitement avec une exactitude sub-millimétrique [43].

I.2 – 2.f. La « radiobiologie »

Parallèlement à ces évolutions techniques, la recherche en « radiobiologie » évolue vite [44]. La radiothérapie vectorisée fait partie des progrès réalisés dans le domaine de la radiothérapie. Elle consiste à utiliser un atome radioactif couplé à une molécule porteuse ou vecteur qui va se concentrer préférentiellement dans la lésion cible ou à son voisinage immédiat [45, 46].

Cela va donc conduire à une destruction cellulaire dans une zone bien déterminée. On parle de radiothérapie métabolique. Une forme un peu particulière de cette radiothérapie est la radioimmunothérapie dans laquelle la molécule porteuse est un anticorps [31]. Afin d'optimiser cette technique il a été proposé de la diviser en 2 étapes. Une étape, de quelques jours, de fixation des anticorps sur les cellules cibles et une seconde étape, de quelques heures, de fixation de l'élément radioactif. Cela permettrait de diminuer considérablement l'irradiation des tissus sains. On parle alors de « pretargeting ». Une autre innovation passe par l'utilisation d'interféron, connu pour up-réguler l'expression des antigènes, avant l'administration de la radioimmunothérapie. Cela permet une plus grande fixation de l'anticorps radioactif sur les cellules tumorales. Cette potentialisation de la radioimmunothérapie peut aussi passer par l'utilisation d'agents vasoactifs qui rendent la tumeur plus accessible aux anticorps marqués [46]. Afin d'optimiser la radiothérapie, d'autres approches ont été réalisées. Elles font appel à l'utilisation de différentes substances. Certaines influencent la réparation de l'ADN après irradiation et vont rendre la tumeur plus radiosensible, d'autres interviennent en diminuant l'altération des tissus sains [45].

I.2 – 3. La chimiothérapie

I.2 – 3.a. Généralités

Avant les années 1950, le traitement anticancéreux était essentiellement basé sur la chirurgie. Dès les années 1960, avec l'avènement de l'accélérateur linéaire de particules, la radiothérapie est apparue comme une aide précieuse dans le contrôle local et régional de la maladie cancéreuse. La chimiothérapie, à l'inverse de la chirurgie et de la radiothérapie, n'a pas pour but de détruire la tumeur localement mais d'éviter l'échappement tumoral secondaire à la formation de métastases à distance. Le développement de la chimiothérapie dans la lutte contre le cancer commence dans les années 1940. En 1942, Louis Goodman et Alfred Gilman constatent une hypoplasie lymphoïde et une myélosuppression sévère lors de l'autopsie de soldats de la 1^{ère} guerre mondiale exposés à des gaz comportant des moutardes azotés. Ils administrent alors une moutarde azotée à un patient porteur d'un lymphome malin non Hodgkinien et constatent une régression tumorale [47]. Ce n'est que plus tard que le mécanisme de ces agents pharmaceutiques sera élucidé. En 1937, Lucy Wills démontre l'implication de l'acide folique dans l'anémie mégalo-blastique. Cette vitamine semble par ailleurs majorer la prolifération cellulaire lors de son injection chez des enfants porteurs d'une leucémie lymphoblastique aigüe. En 1948, devant de telles constatations, Sydney Farber, développe avec succès le traitement par antifolates chez ces enfants.

Les différents médicaments utilisés dans les protocoles de chimiothérapies ne sont pas spécifiques des cellules tumorales et vont être aussi toxiques pour les cellules saines et ce d'autant plus que le tissu à une activité mitotique importante. La plupart des agents de chimiothérapie agissent en perturbant la division cellulaire et vont donc être plus efficaces sur les tumeurs très actives en termes de réplication. En dehors des protocoles de chimiothérapies massives qui conduisent le plus souvent à une période d'aplasie profonde comme c'est le cas pour la leucémie aigüe, la plupart des protocoles font appel à des cures successives. On n'observe alors que des aplasies modérées qui vont récupérer entre les cures. Cet intervalle de temps entre chaque cure permet aux cellules souches normales mais aussi tumorales de récupérer tout en sachant que les cellules saines récupèrent souvent plus rapidement que les cellules cancéreuses en fonction, bien sûr, de l'état physiologique du patient. La majorité des chimiothérapies sont administrées par voie intraveineuse, on comprend ainsi mieux l'importance de la vascularisation tumorale afin que ces molécules antimitotiques soient actives. Il est nécessaire de bien positionner la chimiothérapie par rapport à la chirurgie et à la

radiothérapie qui modifient la vascularisation tumorale. Il existe par ailleurs différentes barrières naturelles à la diffusion de ces molécules comme la barrière hémato-encéphalique qui rend les tumeurs cérébrales ou les métastases cérébrales peu sensibles à la chimiothérapie. Différentes familles de chimiothérapies existent.

I.2 – 3.b. Les antimétabolites

Les antimétabolites inhibent la synthèse des acides nucléiques nécessaire à la multiplication cellulaire [48]. Deux sous-groupes existent: les inhibiteurs d'enzymes indispensables, dont le chef de file est le Méthotrexate, et les médicaments leurres. On peut en rapprocher une autre classe thérapeutique qui correspond à la L-asparaginase. Le Méthotrexate inhibe la synthèse de l'acide folinique indispensable pour la synthèse des bases nucléiques uridine et thymidine. Son action passe par l'inhibition de la dihydrofolate réductase, empêchant ainsi l'activité de la thymidilate synthétase nécessaire pour l'incorporation de nucléotides dans l'ADN [49, 50]. D'autres molécules antifoliques sont actuellement commercialisées [51]. Les médicaments leurres ont une structure chimique proche de composants métaboliques intermédiaires indispensables à la synthèse des acides nucléiques. Ils vont donc être incorporer à la place de ces composants du fait de leur analogie de structure et bloquer la multiplication cellulaire. Au sein de ces substances leurres, on distingue les anti-pyrimidiques qui ressemblent à la cytosine, à la thymine ou à l'uracile. Elles sont plus connues sous le nom de 5-Fluoro-Uracile (5FU) ou encore Gemcitabine. Le 5FU a cependant un mécanisme d'action plus complexe puisqu'il agit aussi au niveau de la thymidilate synthétase. Les anti-puriques possèdent une structure proche de la guanine ou de l'adénine comme c'est le cas pour la 6 Mercapto-Purine ou la Fludarabine.

I.2 – 3.c. Les agents alkylants

Une autre classe de chimiothérapie anticancéreuse fait appel aux agents alkylants. Là encore, 2 sous-groupes existent: les alkylants simples brins et les alkylants double brins. Les 1^{ers} créent un lien chimique covalent fort entre eux et un ou plusieurs groupements « carboxy » d'un acide nucléique. Cela rend le dédoublement des 2 brins d'ADN lors de la division cellulaire difficile, arrêtant la transcription. La division cellulaire ne peut donc plus se faire. Au sein des ces agents alkylants simple brin on distingue les alkylants mono-fonctionnels qui ne possèdent qu'un lien chimique avec l'ADN et les agents alkylants bi-fonctionnels qui créent de véritables ponts entre différents secteurs d'ADN. Les agents alkylants mono-fonctionnels ne conduisent parfois pas à la mort cellulaire du fait de l'existence de systèmes

de réparation de l'ADN et peuvent même parfois induire des anomalies géniques. De nombreuses molécules rentrent dans cette classe des agents alkylants simple brin monofonctionnel comme le Cyclophosphamide Endoxan® ou le Melphalan Alkérán®. Elles ont encore appelées « moutardes azotées ». Les agents alkylants double brins créent des liaisons covalentes entre les 2 chaînes d'ADN générant des désordres plus durs à réparer. Dans les agents alkylants double brins, on retrouve les sels de platine, les nitrosurées et la mitomycine ou Amétycine®. Trois sels de platines sont actuellement en 1^{ère} ligne: le Cisplatine Cisplatyl®, le Paraplatine Carboplatine® et l'Oxaliplatine Eloxatine®. Ils se fixent au niveau de l'atome 7 des guanines et forment des ponts entre les 2 chaînes d'ADN [52]. Différents ponts peuvent être formés: des ponts intra-brins entre 2 guanines, des ponts intra-brins entre une guanine et une adénine et des ponts inter-brins entre 2 guanines proches. Les nitrosurées telle que la Carmustine BICNU® touchent directement les cellules souches médullaires et conduisent à des dommages longs à réparer.

I.2 – 3. d. Les modificateurs de l'ADN

Les modificateurs de l'ADN constituent une autre famille d'agents anticancéreux. La conformation de l'ADN doit être modulable en particulier lors de la transcription et de l'auto-reproduction. La perte de labilité de cette structure par l'action des anti-topoisomérases et des agents intercalants en font des agents anticancéreux très actifs. Lors de la transcription, pour que la fourche de réplication se déplace, il faut que l'hélice de l'ADN se déroule ce qui requiert l'intervention des topoisomérases. Il existe 2 types d'anti-topoisomérases: les anti-topoisomérases de type I qui empêchent la reconstitution d'un brin d'ADN après son clivage et qui sont connus sous les noms d'Irinotécan Campto® ou de Topotécan Hycamtin® et les anti-topoisomérases de type II qui conduisent à la persistance de 2 brins d'ADN qui ne peuvent pas être ressoudés que l'on appelle Etoposide Vepeside® et Téniposide Vehem® [53]. Les agents intercalants induisent eux aussi une perturbation de la conformation tridimensionnelle de l'ADN. Initialement l'hypothèse retenue était celle de l'intercalation de produits chimiques plans qui rigidifiaient l'ADN et empêchaient sa transcription. Actuellement l'hypothèse concernant le mode de fonctionnement des ces agents pharmacologiques fait intervenir une compétition avec les topoisomérases. Par ailleurs, ils pourraient conduire à des lésions de l'ADN tumoral par l'intermédiaire des radicaux libres qu'ils génèrent et une altération des membranes des cellules cancéreuses par des mécanismes de peroxydation lipidique [54]. Dans cette famille de molécules, on retrouve les anthracyclines dont les plus administrées sont la Doxorubicine et l'Epirubicine. D'autres

molécules sont incluses dans la famille des modificateurs de l'ADN. Il s'agit entre autre de la Bléomycine qui a une action destructrice directe sur l'ADN en formant des complexes avec une ou plusieurs de ses branches. Cette action semble indépendante du caractère proliférant de la tumeur. On range aussi parmi cette grande famille l'Hydroxycarbamide ou Hydréa® qui a une action directe sur la synthèse d'ADN.

I.2 – 3.e. Les poisons du fuseau

Les poisons du fuseau représentent la 4^{ème} classe de chimiothérapie anticancéreuse. Ils interviennent en entraînant une désorganisation au moment de la mitose quand les chromosomes dédoublés doivent migrer le long des tubules du fuseau cellulaire vers les pôles opposés avant la séparation des 2 cellules filles. Les molécules les plus couramment utilisées sont la Vincristine Oncovin® et la Vinorelbine Navelbine®.

I.2 – 3.f. Les taxanes

L'activité anticancéreuse des Taxanes passe par le rassemblement, la stabilisation et l'inhibition de la dépolymérisation des microtubules cellulaires entraînant la perturbation de différentes fonctions cellulaires comme la mitose, le maintien et le changement de la morphologie cellulaire [55-57]. Les cellules sont arrêtées dans leur division en phase G2 et au cours de la mitose. Deux produits sont actuellement disponibles le Paclitaxel Taxol® et le Docétaxel Taxotère®.

I.2 – 3.g. Les différents types de chimiothérapie

Quatre grands types de chimiothérapie existent:

- la chimiothérapie à visée curative.
- la chimiothérapie adjuvante.
- la chimiothérapie néo-adjuvante.
- la chimiothérapie à visée palliative.

La chimiothérapie à visée curative peut conduire à la guérison du malade comme c'est le cas pour certaines leucémies ou certains lymphomes.

En 1974, l'équipe d'Emil Frei démontre que de fortes doses de Methotrexate diminue le nombre récidive d'ostéosarcome après leur résection chirurgicale faisant naître le concept de chimiothérapie adjuvante. La chimiothérapie adjuvante vise à augmenter les chances de survie du patient. Elle est prescrite après une chirurgie ou une radiothérapie qui constitue alors l'acte principal. Elle a pour but de traiter la maladie métastatique.

La chimiothérapie néo-adjuvante ou d'induction tente de réduire la masse tumorale pour pouvoir envisager un traitement conservateur qui ne l'était pas initialement. Elle permet aussi de lutter contre la maladie métastatique et d'évaluer la réponse de la tumeur à ce protocole de chimiothérapie.

La chimiothérapie à visée palliative a pour but d'améliorer le confort de vie du patient.

I.2 – 3.h. Polychimiothérapie et phénomènes de résistances

La plupart des protocoles de chimiothérapie font appel à plusieurs molécules, on parle de polychimiothérapie. Les objectifs de cette association reposent sur l'utilisation d'agents de mécanisme d'action différent qui parfois en plus d'avoir une action additive, se potentialisent. Par ailleurs, s'ils ont des toxicités différentes, cette association permet d'augmenter la puissance de la chimiothérapie sans en majorer la toxicité. Expérimentalement, on peut observer un effet de recrutement ou de synchronisation induit par certaines chimiothérapies qui bloquent les cellules cancéreuses dans une phase du cycle cellulaire. Il est alors possible de prescrire un second agent mitotique phase dépendant qui sera alors pleinement efficace. Malheureusement, *in vivo*, cet effet apparaît moindre. La prescription d'une polychimiothérapie permet aussi de lutter contre les phénomènes de résistance qui sont natifs ou acquis. Des phénomènes de résistance croisée entre différentes molécules existent expliquant que le patient soit résistant à une chimiothérapie avant son administration. Différents mécanismes pharmacodynamiques expliquent ces phénomènes de résistance. Ils peuvent correspondre à une diminution de l'entrée de l'agent de chimiothérapie dans la cellule par altération du transporteur, une augmentation de sa sortie par l'intermédiaire de certaines protéines membranaires, ce qui amène à évoquer le phénomène de MultiDrug Resistance (MDR). Cette résistance pléiomorphe explique certaines résistances primaires ou acquises. Elle fait intervenir essentiellement la P-glycoprotéine (P-gp) [58]. Cette protéine fait partie de l'une des familles de protéines de transport (transporteurs ABC). Elle est codée par le gène MDR1 et provoque l'efflux d'agents toxiques hors de la cellule en consommant de l'ATP [59]. Certaines tumeurs présentent un taux naturellement élevé de P-gp, d'autres qui l'exprimaient initialement à un taux faible voient leur production augmenter. Cette résistance se développe initialement contre les agents de chimiothérapie mais va ensuite s'élargir à une multitude d'autres médicaments. Elle est responsable d'environ 50% de l'ensemble des échecs thérapeutiques de la chimiothérapie. Une nouvelle approche thérapeutique est axée sur le développement d'inhibiteurs de la P-gp et le développement de chimiosensibilisateurs qui diminueraient l'expulsion des antimétabolites hors de la cellule. D'autres mécanismes de

résistance à la chimiothérapie existent en particulier contre les produits qui nécessitent une transformation intracellulaire pour être actifs avec l'apparition d'une diminution de cette activation, une inactivation spécifique ou une inactivation non spécifique. L'altération qualitative ou quantitative de la cible thérapeutique voire l'augmentation de la réparation des lésions de l'ADN peuvent aussi expliquer ces phénomènes de résistance.

I.2 – 4. L'hormonothérapie

I.2 – 4.a. Généralités

Le concept d'hormonothérapie repose sur l'hormono-dépendance de certains cancers, les plus connus étant celui du sein, de la prostate, de l'endomètre, de l'ovaire, de la thyroïde, du poumon mais aussi les leucémies et les lymphomes.

Les mécanismes d'action des différents traitements spécifiques des cancers hormono-dépendants répondent au schéma suivant :

- la disparition de l'hormone stimulante.
- l'action d'une anti-hormone agissant sur le récepteur.
- l'inhibition de la synthèse des hormones ou du dérivé actif.

C'est en 1896 que Georges Thomas Beatson a montré que la castration chirurgicale de femmes pré-ménopausées présentant un cancer du sein métastatique conduisait à la rémission de celui-ci [60, 61]. Secondairement, Huggins *et al.*, ont obtenus le même résultat après l'ablation des surrénales et de l'hypophyse chez des femmes ménopausées. Quelques décennies plus tard, la présence de récepteurs aux œstrogènes (RE) a été montrée dans des cellules d'utérus de rat. Ces données ont alors été transposées à la recherche clinique et des récepteurs aux œstrogènes ont été découverts au niveau des cellules de certains cancers du sein. Ainsi, les patients dont les tumeurs exprimaient ces récepteurs répondaient à une privation hormonale contrairement à celles dont les tumeurs ne présentaient pas de tels récepteurs. Ce n'est que plus tard, dans les années 80, que la production *in situ* d'œstrogènes dans le cancer du sein a été montrée. Actuellement, du fait du problème de santé publique majeur qu'ils représentent, ce sont les cancers du sein et de la prostate qui stimulent le plus la recherche dans ce domaine thérapeutique. Nous nous limiterons, ici, à l'étude de l'hormonothérapie dans le cancer du sein.

I.2 – 4.b. Les récepteurs hormonaux.

D'un point de vue physiologique, l'action des hormones stéroïdes sexuelles, aussi bien des œstrogènes que de la progestérone ou encore des androgènes, présente des points communs. Elles activent toutes des récepteurs nucléaires spécifiques qui vont stimuler la croissance et la division cellulaire dans leur tissu cible. Cela en fait de potentiels agents promoteurs de tumeurs. Différents types de récepteurs ont été décrits, les récepteurs GR (Glucocorticoid Receptor), ER (Estrogen Receptor), AR (Androgen Receptor) et PR (Progesterone Receptor).

Tous sont des Steroid Hormone Receptors (SHRs) qui sont des protéines constituées de 427 à 984 acides aminés avec des zones d'analogie importantes [62]. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires qui comprend les récepteurs aux hormones stéroïdiennes, aux hormones thyroïdiennes, à la vitamine D, à l'acide rétinoïque et aux eicosanoïdes. Ces récepteurs, activés par la fixation de l'hormone, vont interagir avec des protéines de régulation qui ont un rôle d'activateur ou de répresseur de la transcription de l'ADN. En fonction de cette régulation positive ou négative, les récepteurs vont se lier avec certaines séquences spécifiques d'ADN (ERE ou *Estrogen Response Elements* pour le récepteur aux oestrogènes). Ces récepteurs possèdent des domaines d'action différents dont le domaine de reconnaissance spécifique de l'hormone et celui de liaison avec l'ADN. La dysrégulation du complexe SHR – protéine activatrice ou répressive conduit à l'apparition de phénotypes malins.

I.2 – 4.c. Œstrogènes et cancer du sein

Ainsi, dans le cancer du sein, on assiste lors de la liaison entre les œstrogènes et leurs récepteurs à l'amplification de certains gènes ou à des effets génotoxiques directs conduisant à des aneuploïdies ou des aberrations chromosomiques. Par ailleurs, en stimulant la prolifération des cellules épithéliales mammaires, les œstrogènes augmentent le risque d'erreurs lors de la réplication de l'ADN pouvant conduire à l'apparition de clones cellulaires malins. Dans l'unité ductulo-lobulaire terminale de la glande mammaire, il persiste des cellules souches qui se divisent très lentement mais qui sont exposées à l'accumulation de mutations tout au long de la vie du fait de leur immortalité. Certaines de ces cellules souches expriment des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone [63]. Les œstrogènes en amplifiant cette population pourraient favoriser le développement de cancers hormonodépendants. Le rôle des œstrogènes tout comme celui de la progestérone dans les étapes de la cancérogénèse mammaire reste cependant non totalement élucidé. A noter que les récepteurs à la progestérone sont aussi synthétisés sous l'action des œstrogènes, ils sont donc le reflet, à la fois, de l'action des œstrogènes et de la progestérone au niveau des cellules cancéreuses. Il est donc maintenant largement admis que les œstrogènes, via leurs récepteurs, sont des promoteurs de tumeur et qu'il est efficace de réduire leur action et leur production. L'hormonothérapie adjuvante dans le cancer du sein s'adresse aux cancers constitués de cellules RE-positives. La détection de ces récepteurs peut faire appel à des techniques isotopiques, biochimiques mais surtout immunohistochimiques (technique de référence). Le seuil de positivité est défini par au moins 10% de cellules marquées [64]. C'est un facteur

prédictif primordial de réponse au traitement hormonal qui a contribué à la réduction de la mortalité par cancer du sein décrite depuis la fin des années 1990. Les cancers du sein hormonodépendants représentent 60% des cancers du sein diagnostiqués chez les femmes préménopausées et 80% de ceux découverts après la ménopause. Le développement des anti-œstrogènes dans le traitement du cancer du sein a commencé dans les années 1930.

I.2 – 4.d. Les anti-œstrogènes

Depuis les années 1970 jusqu'à récemment, le Tamoxifène (Nolvadex®) était considéré comme la principale hormonothérapie adjuvante permettant une réduction du risque de décès dans le cancer du sein de 26 %, une diminution de 42% du risque de rechute et de 47% du risque de cancer du sein controlatéral (méta-analyse d'Oxford, 1998) [65]. Cette molécule de structure chimique non stéroïdienne fait partie des SERMs ou Selective Estrogen Receptor Modulators qui se lient de manière spécifique aux récepteurs des œstrogènes. Le Tamoxifène peut être considéré comme une pro-drogue car il nécessite 2 transformations, respectivement médiées par le cytochrome P450 et la molécule CYP 2D6, pour être actif. Ces 2 étapes induisent l'existence de variations génétiques de métabolisation avec des métaboliseurs lents et des métaboliseurs rapides. De même, l'administration simultanée de certains médicaments réduit le métabolisme du Tamoxifène. Le Tamoxifène peut se lier aux 2 isoformes du récepteur aux œstrogènes : RE α et RE β qui sont codés par 2 gènes distincts [61, 66]. Il exerce un effet antagoniste et agoniste partiel des œstrogènes quand il se lie à RE α et un effet antagoniste pur des œstrogènes quand son effet est médié par RE β . Ainsi, il a un effet prédominant anti-œstrogénique au niveau du sein, du vagin et du système nerveux central. Dans la majorité des autres tissus cibles, ses effets prédominants sont œstrogéniques, en particulier au niveau de l'endomètre, de l'os et du foie. L'effet agoniste faible du Tamoxifène peut être bénéfique puisqu'il prévient la déminéralisation osseuse induit par la chute du taux d'œstrogènes mais est aussi délétère car il conduit à une augmentation de l'incidence des cancers de l'endomètre et des accidents thromboemboliques. A noter qu'il présente un effet favorable sur le métabolisme lipidique avec une réduction du cholestérol total et du LDL cholestérol mais sans augmentation du HDL cholestérol. Au niveau du tissu mammaire, alors que la liaison des œstrogènes à leur récepteur favorise l'interaction avec des protéines activatrice, la liaison du Tamoxifène au récepteur des œstrogènes conduit à une interaction préférentielle avec des protéines répressives. Son effet principal est cytostatique par blocage du cycle cellulaire en phase G1. Il diminue la proportion des cellules tumorales en phase S et diminue ainsi la prolifération tumorale. Le Tamoxifène régule donc la réplication cellulaire

par une action directe sur le noyau cellulaire mais aussi par l'intermédiaire des facteurs de croissance. Les indications actuellement reconnues de l'utilisation du Tamoxifène dans le traitement du cancer du sein sont les suivantes : cancer du sein métastatique chez la femme ménopausée et cancer du sein avancé non métastatique chez la femme ménopausée.

I.2 – 4.e. Les anti-aromatases

Plus récemment, depuis la fin des années 1990, des molécules inhibant spécifiquement l'aromatase ont démontré une efficacité supérieure à celle du Tamoxifène sur le risque de rechute, sur le risque de survenue de cancer controlatéral mais pas terme de survie globale. En effet, chez les femmes pré-ménopausées, les œstrogènes proviennent principalement de la sécrétion ovarienne alors que chez les femmes ménopausées, des œstrogènes continus à être synthétisés par aromatisation d'androgènes d'origine surrénalienne. Cette étape d'aromatisation est spécifique et irréversible [67]. L'aromatase est un complexe enzymatique responsable de la synthèse des œstrogènes à partir d'androgènes par décarboxylation du C(19) et aromatisation du cycle A du stéroïde [68]. Ce complexe est formé d'une forme spécifique de cytochrome P450 et d'une flavoprotéine [60]. L'activité aromatase la plus forte est retrouvée au niveau du placenta et des cellules de la granulosa des follicules ovariens [61]. Cette activité est aussi retrouvée dans le tissu adipeux, le foie, le muscle, le cerveau et le sein normal. Elle constitue une véritable sécrétion paracrine d'œstrogènes. Cela explique qu'à l'état physiologique, les taux d'œstradiol dans le tissu mammaire de la femme ménopausée soient 4 à 6 fois supérieurs aux taux plasmatiques [64]. Il est important de noter que l'aromatase est aussi exprimée au niveau du tissu mammaire tumoral. Ainsi, la concentration d'œstrogènes à ce niveau est supérieure à la concentration plasmatique du fait de l'activité aromatase intra-tumorale et ceci quel que soit le statut en RE de la tumeur et le statut ménopausique de la patiente. On constate alors que les taux d'œstradiol et l'activité de l'aromatase sont multipliés par 1,7 par rapport à la normale. Les inhibiteurs d'aromatases (IA) vont inhiber cette synthèse entraînant un effondrement de l'œstradiolémie chez les femmes ménopausées, ce qui n'est pas observé en cas de pré-ménopause du fait de l'élévation des gonadotrophines par rétrocontrôle. Ces molécules seront donc utilisées chez des femmes ménopausées depuis au moins 1 an et porteuses d'une tumeur à priori hormonosensible. Il existe 3 générations d'anti-aromatases [68]. Le premier inhibiteur d'aromatase utilisé dans le traitement du cancer du sein avancé fut l'Aminoglutéthimide Orimétène®. Il induit une véritable surrénalectomie médicale nécessitant l'association à un traitement par hydrocortisone pour compenser l'inhibition de synthèse des glucocorticoïdes [26]. Seuls les

inhibiteurs des aromatasés les plus récents de 3^{ème} génération ont une grande spécificité d'action.

Deux types d'inhibiteurs d'aromatase sont définis en fonction de leur structure et de leur mode d'action [69]:

- 1/ les inhibiteurs de type I, stéroïdiens qui sont des analogues structuraux du substrat, l'androsténedione. Ils entrent en compétition avec le substrat naturel de l'enzyme. Ils sont spécifiques et ont un effet durable en se liant de façon irréversible (Formestane Lentaron® IA de 2^{ème} génération, Exemestane Aromasine® IA de 3^{ème} génération).

- 2/ les inhibiteurs non stéroïdiens de type II qui sont des dérivés azolés. Ils interfèrent avec l'hydroxylation des hormones stéroïdes par liaison avec le fer du radical hème de l'aromatase. Ils inhibent de façon réversible l'enzyme (Anastrozole Arimidex® IA de 3^{ème} génération, Létrozole Fémará® IA de 3^{ème} génération).

I.2 – 4.f. Autres traitements hormonaux

En plus des antagonistes forts des œstrogènes avec effet agoniste faible comme le Tamoxifène ou le Torémifène, des inhibiteurs des aromatasés, deux autres approches pharmacologiques existent afin de bloquer l'action des œstrogènes dans le cancer du sein : la suppression ovarienne chimique chez la femme pré-ménopausée et les antagonistes purs des récepteurs des œstrogènes qui sont représentés par le Fluvestrant (Fasoldex®). Cette molécule possède les mêmes indications que le Tamoxifène mais contrairement à ce dernier, elle ne possède pas d'effet agoniste faible et accélère la dégradation du récepteur aux œstrogènes lors de la fixation à son niveau. C'est donc un *Estrogen Receptor Downregulator*. Il apparaît au moins aussi actif voire plus actif que les anti-aromatasés.

Concernant le cancer prostatique, les récepteurs hormonaux ont été moins étudiés que dans le cancer du sein. Nous ne développerons pas ce volet dans ce rappel bibliographique.

I.2 – 5. Les nouveaux traitements anticancéreux

En plus de toutes les thérapeutiques évoquées, d'autres traitements anti-cancéreux sont actuellement disponibles. On retrouve ainsi, l'immunothérapie classique, les traitements ciblés comme les anticorps monoclonaux mais aussi les traitements anti-angiogéniques et les traitements anti-protéasomes.

I.2 – 5.a. L'immunothérapie

L'immunothérapie passive non spécifique comprend les différents types d'interférons et l'interleukine 2 [70].

Au sein des interférons, il existe 2 familles:

- les interférons de type I qui comprennent les interférons α , β , τ , ω qui ont une action sur l'inhibition virale, la diminution de la prolifération tumorale ainsi que sur l'immuno-modulation.

- les interférons de type II ou interférons γ qui agissent sur d'autres récepteurs.

En France, seul l'interféron recombinant α_2 -b est commercialisé sous le nom d'Introna® ou Roféron®. La réponse au traitement par interféron dans le cancer est très hétérogène. Les mécanismes impliqués dans leur activité anti-tumorale sont multiples:

- un effet direct sur la prolifération et la différenciation cellulaire.
- diverses inductions enzymatiques.
- une activation d'autres cytokines au niveau tumoral.
- une stimulation de la production d'immunoglobulines anti-tumorales, de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques, de cellules Natural Killer, de macrophages.

- une modulation de l'activité antigénique des antigènes de surface des tumeurs.

L'Interleukine 2 est une cytokine produite par les cellules mononuclées sanguines. Grâce au génie génétique, une interleukine 2 recombinante Proleukin® a pu être créée. Une seule indication, cependant très discutée du fait des effets secondaires de la molécule, reste confirmée en France, il s'agit de l'adénocarcinome rénal métastatique [71].

Parallèlement à l'immunothérapie passive non spécifique, il existe une immunothérapie active non spécifique qui correspond au BCG intra vésical ou Immucyst®. Le mécanisme précis de l'action de ce bacille est mal connu [72]. L'activité tumorale résulte probablement de la réaction inflammatoire que provoque son instillation intra-vésicale créant le rejet des cellules

cancéreuses de la paroi vésicale. Une seule indication est actuellement reconnue, celle du cancer localisé non invasif de la vessie.

Toujours dans l'immunothérapie, grâce à l'identification du risque cancérigène de certains virus comme celui de l'hépatite B ou du papilloma virus, le concept de vaccin anti-cancer s'est développé. De nombreux travaux utilisant des cibles différentes sont en cours. Certains cancers expriment des antigènes spécifiques permettant le développement d'anticorps dirigés uniquement contre les cellules tumorales. Cependant, la majorité des cancers expriment des antigènes normalement présents dans l'organisme. Il est alors indispensable d'orienter l'action des anticorps contre les cellules cancéreuses seules. Les éléments permettant de distinguer une expression antigénique normale d'une expression antigénique pathologique peuvent être:

- quantitatifs, avec une surexpression de l'antigène dans le tissu cancéreux.
- qualitatifs, avec des antigènes plus ou moins différenciés.
- géographiques, avec une expression localisée à certains sites.

Toujours dans l'objectif de développer des vaccins anti-cancer, des plasmides permettant l'incorporation d'ADN dans le génome humain sont étudiés. Cette incorporation permet la synthèse de protéines qui sont ensuite dégradées. Les peptides issus de cette dégradation sont exposés à la surface de certaines cellules. Il en résulte une réponse du système immunitaire cellulaire mais aussi humoral contre les cellules tumorales [73]. Des travaux sont cependant encore nécessaires avant la commercialisation de ces vaccins.

I.2 – 5.b. Les thérapies ciblées

Des progrès existent dans la compréhension des processus moléculaires et génétiques impliqués dans les voies de signalisation intracellulaires qui régulent les différentes activités cellulaires, en particulier la prolifération et la survie. La plupart de ces voies semblent perturbées dans les cellules tumorales. Se développe alors la notion de thérapies ciblées ou « targeted therapy » [47]. Ces thérapeutiques anti-cancéreuses plus ciblées sont basées sur la nécessité d'une transmission de signaux et d'une stimulation cellulaire constante par des facteurs de croissance pour maintenir l'homéostasie dans un organisme pluricellulaire. Schématiquement, on assiste à la fixation d'un facteur de croissance sur un récepteur transmembranaire spécifique qui va se dimériser et entraîner une phosphorylation de tyrosine-kinases intracellulaires. Cette succession de phénomènes va conduire à la transmission du signal vers le noyau. Afin de diminuer l'action majeure de ces facteurs dans la croissance tumorale, différentes voies ont été explorées. Tout d'abord, la production d'anticorps anti-récepteur bivalents qui ont la possibilité d'activer la cytotoxicité anticorps dépendante, des

anticorps cytotoxiques par eux-mêmes vis-à-vis du récepteur, des anticorps anti-récepteur couplé à un isotope radioactif ou à un poison cellulaire et enfin des petites molécules qui vont se lier aux tyrosine kinases du récepteur et empêcher son activation [74].

Les applications cliniques de ces nouvelles molécules sont multiples en particulier dans le cancer du sein avec le Trastuzumab Herceptin®. Dans 20 à 30% des cancers du sein, on observe une surexpression du récepteur HER2 qui est associée à une durée de survie plus courte [74]. Sa mise en évidence utilise des techniques immunohistochimiques. Le Trastuzumab est un anticorps murin humanisé IgG1 dirigé contre le récepteur HER2-NEU du facteur de croissance épidermique humain. C'est un anticorps inhibiteur des tyrosine kinases. Il ne doit être prescrit que dans les cancers du sein en situation métastatique ou en situation adjuvante et exprimant ce récepteur. Il diminue l'activation des voies de signalisation régulées par HER2 grâce à différents mécanismes:

- en bloquant l'homo ou l'hétérodimérisation du récepteur, par l'augmentation de l'endocytose du récepteur conduisant ainsi à une augmentation de son élimination et par la diminution du clivage extracellulaire du récepteur.

- par son fragment Fc, le Trastuzumab possède une activité cytotoxique cellulaire anticorps-dépendante (ADCC) permettant l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales humaines qui surexpriment HER2.

Conjointement, en bloquant l'activation du récepteur HER2, il réduit les voies de signalisation PI3K et PTEN ce qui conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire et la promotion de l'apoptose.

Par l'étude du Trastuzumab sur différents modèles animaux, il a été mis en évidence que cette molécule diminuait la vascularisation tumorale en bloquant la néo-angiogenèse. Le taux de réponse à cette thérapeutique est de l'ordre de 50%. Le Panitumumab ou Vectibix® est un anticorps monoclonal anti-EGFR 100% humain. La liaison de cet anticorps à son récepteur entraîne une diminution de la croissance cellulaire, des métallo-protéinases de la matrice extracellulaire, de la vascularisation et une induction de l'apoptose. Cependant, il a été montré que cette molécule était inactive si les cellules tumorales présentaient une mutation de K-Ras, protéine majeure dans la transmission du signal. La mutation K-Ras conduit à une activation continue de la voie de signalisation de l'EGFR. Il faut donc que les patients soient porteurs d'un cancer du colon métastatique sans mutation de K-Ras. Dans certains lymphomes, le Rituximab commercialisé sous le nom de Mabthéra® ou Rituxan® est utilisé. Il s'agit d'un anticorps chimérique murin humanisé dirigé contre l'antigène CD20. L'Ibritumab Tiuxetan® ou Zevalin® peut lui aussi être prescrit, il s'agit d'un « radio-pharmaceutique » associant un

anticorps monoclonal murin recombinant spécifique de l'antigène CD20 à un radio-isotope le ⁹⁰ Yttrium.

Dès 1988, il a été montré que certains inhibiteurs des tyrosine kinases étaient très spécifiques comme c'est le cas pour l'Imatinib ou Glivec®, inhibiteur très puissant et sélectif des tyrosine kinases abl. Il ne s'agit pas d'anticorps mais de petites molécules anti-tyrosine kinases qui agissent en interférant au niveau de la liaison entre les tyrosine kinases et l'ATP. Elles empêchent le transfert du groupement phosphate de l'ATP au résidu tyrosine. Actuellement, 12 inhibiteurs des tyrosine kinases sont approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement de plusieurs cancers [75].

Il existe 2 types d'anti-tyrosine kinases [75]:

- le type I qui se fixe uniquement sur les tyrosine kinases activées.
- le type II qui peut aussi se fixer sur la forme inactive.

Cette activation est indispensable pour que la liaison ATP-tyrosine kinase puisse se réaliser. Il faut cependant noter que des résistances secondaires à ces molécules peuvent apparaître. Cela a été décrit lors du traitement par Alemtuzumab dans la leucémie myéloïde chronique du fait de l'amplification de bcr-abl, de l'apparition d'anomalie chromosomique complémentaire, de phénomènes pharmacologiques aboutissant à un sous-dosage intracellulaire de l'Imatinib ou par l'existence de mutations du gène bcr-abl. En cas de résistance à l'Imatinib, d'autres molécules ayant une activité anti-tyrosine kinase peuvent être utilisées en 2^{ème} ligne (Dasatinib Sprycel®, Nilotinib Tasigna®). Le traitement d'autres cancers peuvent avoir recours aux inhibiteurs des tyrosine-kinases comme c'est le cas pour le cancer du poumon (Gefitinib Iressa®, Erlotinib Tarceva®) [76].

La protéine m-TOR apparaît être une nouvelle cible potentielle du traitement anticancéreux [76]. Dans les cellules saines, la protéine m-TOR intervient dans de nombreuses voies métaboliques et apparaît indispensable pour la survie cellulaire. Elle intervient, par ailleurs, dans la traduction des facteurs inductibles par l'hypoxie qui régulent la capacité des tumeurs à s'adapter à l'hypoxie et à produire le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) responsable de l'angiogénèse. Dans les cellules cancéreuses, la voie m-TOR peut être perturbée de différentes façons. Actuellement, 2 molécules dérivant de la Rapamycine, (Sirolimus Rapamune®) ont trouvé leur place comme traitement anti-cancéreux en interagissant avec la protéine m-TOR. Il s'agit du Temsirolimus Torisel® et de l'Everolimus Afinitor® dans le traitement du cancer du rein.

Le développement de traitement anti-angiogénique apparaît être une autre voie intéressante dans la lutte anticancéreuse [76]. C'est au début des années 1970 que Judah Folkman a

montré pour la 1^{ère} fois le rôle central de la néo-angiogenèse dans la prolifération tumorale et le développement de métastases [77, 78]. Il montre que les cellules tumorales sécrètent des molécules angiogéniques comme le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et le VEGF qui stimulent la formation de nouveaux vaisseaux permettant d'apporter les nutriments nécessaires à l'expansion tumorale. Le chef de fil en est le Bevacizumab ou Avastin® qui est un anticorps monoclonal chimère qui se lie au VEGF et inhibe ainsi la liaison à son récepteur. Son administration conduit à une réduction de la croissance des micro-vaisseaux et à une diminution de la progression des métastases. Il apparaît comme le traitement de 1^{ère} ligne du cancer métastatique du colon ou du rectum [76].

Un des derniers pôles d'intérêt dans la recherche anticancéreuse concerne le système du protéasome qui intervient dans la dégradation des protéines. Comme les cellules normales, les cellules cancéreuses utilisent ce protéasome pour activer des proto-oncogènes, réparer les lésions générées par la chimiothérapie ou encore faciliter la dégradation des protéines à action suppressive. Une des molécules les plus avancées dans cette voie des inhibiteurs du protéasome est le Bortezomib ou Velcade®.

I. 3.- La cardiotoxicité des traitements anticancéreux

Dans ce rappel, nous nous attacherons à préciser les composantes de la toxicité cardiaque des médicaments anticancéreux en rappelant certaines données admises et en insistant plus particulièrement sur la cardiotoxicité des Anthracyclines.

I. 3 – 1. La cardiotoxicité de la radiothérapie

I. 3 – 1. a. Généralités

Bien que le cœur soit un organe relativement radio résistant, il constitue un organe « critique » pour la radiothérapie thoracique ou médiastinale du fait de sa position anatomique [79, 80]. Le myocarde se situe dans la classe de tissu la moins radiosensible à l'opposé des tissus lymphoïde et hématopoïétique qui se classent en 1^{ère} position en termes de radiosensibilité. La traduction clinique de la cardiotoxicité des rayonnements ionisants apparaît pour une irradiation thoracique ou médiastinale supérieure à 30Gy. Cette dose est communément appliquée en cas de maladie de Hodgkin et de lymphome non Hodgkinien. La radiothérapie utilisée dans le traitement du cancer du sein est-elle aussi pourvoyeuse d'altérations de l'architecture et de la fonction cardiaque [81-84]. Récemment, il a été décrit des cas d'atteinte cardiaque après radiothérapie pour cancer de l'œsophage ou du poumon. Pour chaque constituant du cœur: péricarde, myocarde, endocarde, tissu conducteur, artères coronaires, réseaux vasculaires et valves, 3 types de toxicité existent:

- une toxicité subaiguë apparaissant dans les 6 à 12 mois après l'irradiation.
- une toxicité chronique qui se manifeste 1 et 5 ans après la dernière séance de radiothérapie.
- une cardiotoxicité tardive se révélant plus de 5 ans après l'arrêt des rayons.

Une surveillance prolongée des patients est donc indispensable à la vue des délais avant l'apparition d'une éventuelle atteinte cardiaque.

Toutes ces toxicités cardiaques sont regroupées sous le nom de cardiopathies radio-induites ou RIHD. Les mécanismes physiopathologiques relèvent très probablement tous des mêmes phénomènes successifs avec initialement une atteinte de la microcirculation puis une ischémie et enfin une fibrose cicatricielle [79, 85]. Au niveau cellulaire, c'est la micro vascularisation qui est la plus touchée et notamment les cellules endothéliales. Quelque soit le composant cardiaque touché, il existe une relation dose-effet. L'apparition d'une RIHD est rare en dessous de 20Gy, asymptomatique entre 20 et 30 Gy et symptomatique au dessus de 35 Gy.

Les facteurs de risque de la cardiotoxicité de la radiothérapie, en plus de la dose de rayons, sont constitués par le volume de cœur irradié, la dose par fraction, le jeune âge au moment de l'irradiation, le nombre d'années entre l'irradiation et l'évaluation cardiaque, la prescription d'une chimiothérapie cardiotoxique, d'une hormonothérapie ou de Trastuzumab et la présence de facteurs de risque cardiovasculaire [80, 86-88]. Le volume cardiaque recevant 35 Gy doit être inférieur à 30% du volume cardiaque total et la dose par fraction et par jour ne doit pas excéder 2 Gy. La distance maximum au cœur doit être inférieure à 1 cm au cours de l'irradiation des cancers du sein [89]. Cependant, il persiste une incertitude sur les doses de tolérance du cœur, et notamment sur le rapport dose-volume et dose-temps. Il faut malgré tout garder à l'esprit que la RIHD est responsable d'un excès de mortalité cardiaque chez les patients survivants d'un cancer (risque relatif entre 2,5 et 3,5) [90].

I. 3 – 1.b. Atteintes péricardiques

Concernant le péricarde, on assiste initialement à une période inflammatoire avec une augmentation de la prolifération et de la perméabilité vasculaires ainsi qu'à une altération de la fibrinolyse. Cliniquement, ces modifications peuvent se manifester par un tableau de péricardite (2,5 à 20%) qui est souvent associée à un épanchement riche en protéines parfois très abondant. Cependant, l'évolution est généralement lente conduisant rarement à un tableau de tamponnade, la réaction péricardique reste mineure [91]. L'apparition d'une péricardite aiguë ne constitue pas un facteur de risque de développement futur d'une péricardite chronique constrictive et on peut même observer l'apparition de véritable péricardite aiguë jusqu'à 2 ans après l'irradiation. Secondairement, il peut apparaître une fibrose avec le dépôt de collagène et de fibrine au niveau tissulaire ainsi qu'au niveau de la paroi des veines et des lymphatiques conduisant à leur épaississement et à une réduction de la lumière vasculaire. Il en résulte des symphyses péricardiques qui donnent naissance à des tableaux de péricardite chronique voire de constriction. La péricardite chronique affecte 5% des ayant reçu une dose totale supérieure à 40 Gy. Cette incidence serait un peu plus importante après l'irradiation pour un lymphome (10%) que l'irradiation pour un cancer du sein ou un cancer bronchique (1 à 5%). A la dose de 40 Gy, elle entraîne une mortalité de moins de 1%. La dose par fraction, la dose totale et le volume de séreuse irradiée constituent les déterminants essentiels.

I. 3 – 1.c. Atteintes myocardiques

L'atteinte du myocarde serait plus rare que l'atteinte du péricarde [87]. Il existe initialement une atteinte myocardique micro vasculaire aiguë qui se traduit par une myocardite aiguë post-

radique. Cette myocardite est rare mais souvent asymptomatique. Elle voit cependant son incidence augmenter en cas d'association avec une chimiothérapie et en particulier avec les anthracyclines. Histologiquement, elle correspond à une inflammation artériolaire et capillaire ainsi qu'à la présence d'un infiltrat de polynucléaires neutrophiles. Secondairement, on assiste à une destruction de l'endothélium artériolaire et capillaire. Ces lésions peuvent évoluer à bas bruit vers des obstructions micro-vasculaires secondaires à des thromboses ou des micro ruptures des parois vasculaires conduisant à des zones d'ischémie myocardique et de nécroses focales. La cicatrisation du tissu myocardique va être associée à l'apparition d'une fibrose interstitielle plus ou moins extensive qui peut donner naissance à une cardiomyopathie restrictive ou dilatée (2 à 5%). On assiste alors à une véritable fibrose endomyocardique. Le ventricule gauche semble plus fréquemment affecté que le ventricule droit du fait de sa position antérieure [79].

I. 3 – 1.d. Atteintes du tissu conducteur

Parallèlement, cette fibrose peut intéresser le tissu conducteur cardiaque et participer à l'apparition d'une cardiopathie rythmique. Les troubles du rythme et de la conduction peuvent être de différents types: tachycardie supra-ventriculaire (4%), tachycardie ventriculaire (4%), blocs sino-auriculaires, blocs auriculo-ventriculaires de tous degrés et allongement de l'espace QT [89]. Les blocs de conduction infra-nodaux sont les plus fréquents. Environ 5% des patients irradiés vont présenter des troubles conductifs.

I. 3 – 1.e. Atteintes coronariennes

La paroi des artères coronaires, quant à elle, va être complètement « remodelée » avec la destruction des cellules endothéliales conduisant à une migration des cellules musculaires lisses à partir de la média et une disparition de cette couche cellulaire. On constate secondairement l'apparition d'une fibrose, l'épaississement de la média et de l'adventice, la thrombose des vasa-vasorum et l'apparition de plaques intimes fibreuses et pauvres en lipides. On parle d'hyperplasie fibromusculaire endoluminale. Il en résulte une oblitération de la lumière des vaisseaux secondaire à des sténoses fibreuses essentiellement tronculaires et proximales [87]. Les sténoses les plus fréquentes sont celles de l'artère interventriculaire antérieure, en particulier pour les irradiations thoraciques antérieures. Il se pose la question de la potentialisation des lésions d'athérosclérose classique par ces atteintes radiques du fait de l'inflammation de l'endothélium. Il semble alors d'autant plus important d'assurer un contrôle strict des facteurs de risque cardiovasculaire. En plus de la présence

d'autres facteurs de risque cardiovasculaire, l'irradiation avant l'âge de 21 ans constitue un facteur de risque d'atteinte coronarienne radique. Les complications coronariennes apparaissent généralement 5 à 6 ans après l'irradiation. On estime que 20 ans après une irradiation médiastinale, 12 à 37% des personnes vont développer une coronaropathie et jusqu'à 85% un défaut perfusionnel en tomoscintigraphie myocardique. A noter que les tableaux cliniques de l'insuffisance coronarienne post-radique sont similaires à ceux de la population générale. Cependant, la douleur apparaît moins fréquente probablement du fait de la dénervation induite par l'irradiation. Des cas de morts subites par vasospasmes post-radiques ont également été décrits.

I. 3 – 1.f. Atteintes valvulaires.

Au niveau valvulaire, le principal mécanisme serait une atteinte indirecte des valves secondaire à un processus de fibrose myocardique péri-valvulaire entraînant une dysfonction valvulaire [79]. Cependant, une fibrose valvulaire peut aussi s'installer avec un épaissement des valves et l'apparition de calcifications. La valve aortique puis la valve mitrale semblent être atteintes préférentiellement. Il s'agit le plus souvent d'une insuffisance valvulaire. Une régurgitation ou une sténose valvulaire apparaît dans 15 à 30% des cas à 15 ans et dans 45 à 60% des cas à 25 ans. L'atteinte valvulaire est responsable du décès de ces patients dans 0,5% des cas.

I.3 – 2. La cardiotoxicité de la chimiothérapie (tableau 1)

I.3 – 2.a. Cardiotoxicité des Anthracyclines

La cardiotoxicité des anthracyclines est connue depuis la fin des années 60. Elle a été initialement décrite avec la Daunorubicin mais se retrouve chez toutes les anthracyclines avec cependant une incidence différente en fonction de la molécule considérée. L'administration de cette famille de molécules peut conduire à 3 types de cardiotoxicité [90, 92-97]:

- une cardiotoxicité aiguë qui apparaît pendant ou peu de temps après l'administration du traitement. Elle se traduit cliniquement par des troubles du rythme, aussi bien supra-ventriculaires que ventriculaires, compliqués chez certains patients d'une insuffisance cardiaque, d'une myo-péricardite ou d'anomalies électrocardiographiques comme des troubles de la repolarisation ou un allongement du QT sans symptomatologie clinique. Cette cardiotoxicité est habituellement réversible et non dose-dépendante. Elle ne contre-indique pas la poursuite du traitement par anthracyclines. Cependant, des cas de cardiomyopathie aiguë et de mort subite ont aussi été rapportés.

- une cardiotoxicité subaiguë qui apparaît quelques semaines après l'administration du traitement et qui se présente cliniquement sous la forme d'une myocardite. Elle est rare mais responsable de 60% de mortalité.

- une cardiotoxicité chronique des anthracyclines qui se manifeste généralement dans l'année suivant le début du traitement bien que, dans certains cas, son diagnostic ne soit porté que 10 à 20 ans après leur administration. Elle conduit à une dysfonction ventriculaire gauche souvent sévère et l'apparition d'une insuffisance cardiaque congestive. Chez l'adulte, elle prend la forme d'une cardiomyopathie dilatée alors que chez l'enfant, elle conduit plutôt à une cardiomyopathie restrictive. Elle est classiquement définie, chez l'adulte, par une réduction de la FEVG de plus de 5% conduisant à une FEVG inférieure à 55% avec l'apparition de symptômes d'insuffisance cardiaque ou une diminution de la FEVG de plus de 10% devenant inférieure à 55% chez un patient qui reste asymptomatique [98]. Cette cardiotoxicité est dose dépendante mais il semble aussi exister une susceptibilité individuelle [99, 100]. Les patients les plus à risque de développer une cardiomyopathie aux anthracyclines sont les patients ayant des antécédents ou des facteurs de risque cardiovasculaire, l'association de cette chimiothérapie à une radiothérapie médiastinale, à d'autres chimiothérapies ou immunothérapies, les âges extrêmes de la vie et les patients de sexe féminin [91, 95, 96, 101]. Il est difficile d'apprécier son incidence du fait des différents marqueurs diagnostics utilisés.

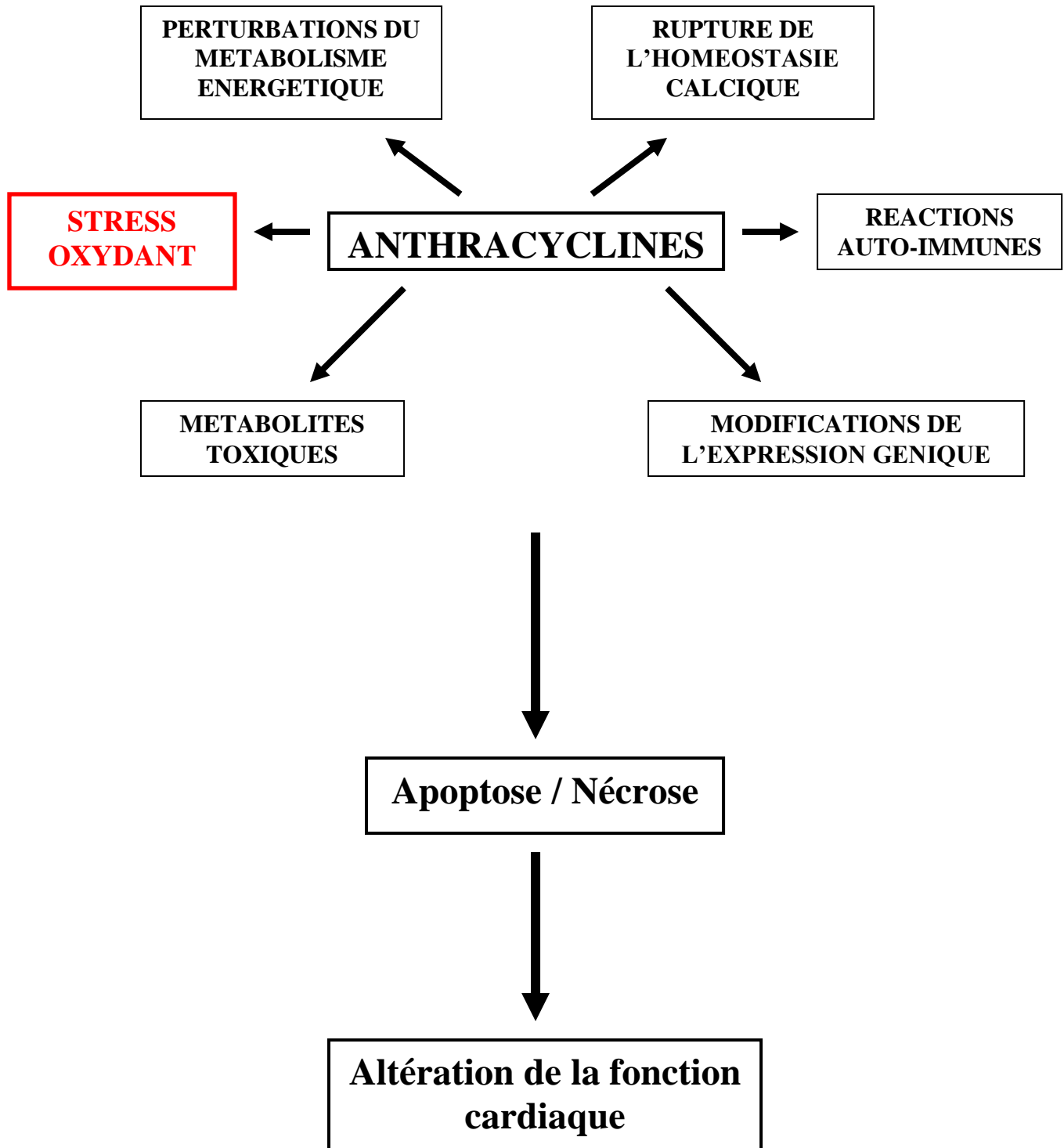
L'étude histologique de biopsies endomyocardiques de tissu atteint met en évidence une déformation du réticulum sarcoplasmique, la formation de vacuoles, des distorsions myofibrillaires, une raréfaction des myofibrilles ainsi qu'une nécrose myocardique [87]. Il est important de souligner que les Anthracyclines ont une très grande affinité pour certains phospholipides, en particulier la cardiolipine. Ce phospholipide se trouve essentiellement dans la membrane interne de la mitochondrie. Les cellules myocardiques étant très riches en mitochondries, on assiste à une accumulation d'Anthracyclines du fait de cette affinité.

La physiopathologie de la cardiotoxicité des Anthracyclines fait essentiellement intervenir le métabolisme du fer et le stress oxydant dont l'impact sera étudié plus précisément dans un chapitre ultérieur [97, 102]. Cependant d'autres mécanismes entrent aussi en jeu (schéma 2) [54, 91-93, 96, 97, 99, 103-106]. Ainsi, récemment, le rôle des topoisomérases 2 a été évoqué [98, 107]. Il existe 2 isoformes de topoisomérases 2 chez les mammifères: la topoisomérase 2 α et la topoisomérase 2 β . L'activité anti tumorale des anthracyclines fait intervenir la topoisomérase 2 α et conduit à la formation d'un complexe topoisomérase 2 α -structure quaternaire de l'ADN. L'isoforme 2 α est présente uniquement dans les cellules à fort taux de réplication et donc dans les cellules tumorales contrairement à l'isoforme 2 β exprimée dans le tissu cardiaque de l'adulte [98]. La cardiotoxicité des anthracyclines serait donc partiellement secondaire aux altérations de l'ADN induite par l'interaction entre ces molécules et la topoisomérase 2 β . Cela conduirait à une inhibition sélective de l'expression de certains gènes cardiaques entraînant une perte en myofilaments cardiaques mais aussi la suppression de gènes de facteurs de transcription impliqués dans la survie cellulaire et la synthèse de protéine du sarcomère [106]. Cette interaction Anthracyclines- topoisomérase 2 β pourrait être à l'origine d'une diminution de l'expression de l'ARN messager de la calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique conduisant à une diminution de la contractilité myocardique.

Par ailleurs, un autre mécanisme participerait à la cardiotoxicité des anthracyclines. Il ferait intervenir le Doxorubicinol [108]. Ce métabolite de la Doxorubicine entraînerait un dysfonctionnement dans la production d'énergie par la cellule, l'altération des membranes cellulaires et la perturbation dans les mouvements ioniques avec une accumulation de calcium intracellulaire avec perte de l'homéostasie calcique [106]. Il en est de même pour l'Epirubicine. L'Epirubicinol formé à partir de l'Epirubicine sous l'action d'enzymes NADPH oxydases serait capable d'inhiber certaines ATPases membranaires calcium dépendantes du réticulum sarcoplasmiques conduisant à des anomalies des flux calciques. Une réponse auto-immune dirigée contre la membrane des cardiomyocytes dont le fonctionnement serait perturbé par les anthracyclines amplifierait aussi la cardiotoxicité de ces molécules. D'autres

mécanismes semblent participer à cette toxicité cardiaque comme l'activation de facteurs de transcription conduisant à l'initiation des mécanismes d'apoptose cellulaire.

Schéma 2: Mécanismes physiopathologiques de la cardiotoxicité des Anthracyclines.



I.3 – 2.b. Cardiotoxicité des antimétabolites

La cardiotoxicité induite par les antimétabolites est essentiellement le fait du 5-Fluorouracil ou des autres Fluoropyrimidines. Elle a été décrite pour la 1^{ère} fois en 1975 [86]. Elle est actuellement estimée entre 1,6 et 9%. Les décompensations cardiaques sur dysfonction ventriculaire gauche représentent plus de 25% des tableaux cliniques rencontrés [109]. Les autres manifestations sont variées allant de l'angor à la mort subite en passant par l'infarctus du myocarde et les troubles du rythme. Les mécanismes responsables de la cardiotoxicité du 5-FU restent mal compris [110]. Initialement, devant le caractère régressif de la symptomatologie à l'arrêt de la perfusion et devant l'absence de lésions coronaires lors de la coronarographie de ces patients, l'hypothèse de spasmes coronaires sous 5-FU avait été évoquée. Ces spasmes auraient trouvé leur origine dans la libération de substances vasoconstrictrices comme l'endothéline 1. Cependant, l'hypothèse du spasme ne permet pas de répondre à toutes les interrogations [111]. En effet, dans certains cas, les traitements anti spastiques sont inefficaces dans la prévention de la survenue des spasmes. Par ailleurs, la réalisation de tests au méthergin chez ces patients n'induit pas systématiquement un spasme et les signes électrocardiographiques et échocardiographiques de cette cardiotoxicité apparaissent diffus contrairement au spasme qui ne touche qu'un territoire myocardique. Les autres hypothèses avancées pour expliquer cette cardiotoxicité sont multiples. On retrouve entre autre [109]:

- des phénomènes auto-immuns.
- une toxicité directe sur l'endothélium coronaire conduisant à l'activation de l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombi .
- une toxicité directe sur le myocarde aboutissant à une véritable myocardite confirmée histologiquement.
- toxicité secondaire à la présence d'impuretés fluorées se transformant en composés cardiotoxiques. Le 5-FU est métabolisé en 5-fluoro-beta-alanine qui est transformé à son tour en fluoroacetate puis en fluorocitrate qui conduit à une accumulation d'acide citrique et à une déplétion en adénosine triphosphate.

Certains facteurs ont été reconnus comme favorisant cette cardiotoxicité. Parmi eux, les antécédents de maladie coronaire, une chimiothérapie cardiotoxique ou une radiothérapie concomitante et l'administration continue de 5-FU [91, 110, 111]. La survenue de manifestations cardiaques sous 5-FU doit conduire à un arrêt définitif de cette thérapeutique. Même si cette cardiotoxicité apparaît réversible après arrêt du traitement, la reprise du 5-FU conduit dans 82% des cas à une récurrence plus précoce et plus importante de cette

cardiotoxicité qui n'apparaît pas prévenue par l'administration de traitements anti-ischémiques [109].

I.3 – 2.c. Cardiotoxicité des agents alkylants

Parmi les agents alkylants, le Cyclophosphamide peut conduire à une atteinte cardiaque sévère [99]. Elle peut se traduire uniquement par des modifications électrocardiographiques asymptomatiques comme un microvoltage, un allongement de l'intervalle QT ou des anomalies de l'onde T et du segment ST. On assiste cependant parfois à l'apparition de troubles du rythme ou de la conduction, des épisodes de décompensation cardiaque voire de véritables chocs cardiogéniques [101]. Le Cyclophosphamide est aussi à l'origine d'une ischémie myocardique du fait de phénomènes vasospastiques et thrombotiques au niveau vasculaire. Cette cardiotoxicité n'est pas corrélée à la dose cumulée mais plutôt à l'importance d'une dose. Toutes ces complications sont plus fréquentes chez les personnes âgées, les patients ayant déjà été traités par anthracyclines ou ayant bénéficiés d'une irradiation médiastinale [86]. La cardiotoxicité d'un autre agent alkylant, le Cisplatine, doit d'être citée. En plus d'une toxicité aiguë, le Cisplatine possède une cardiotoxicité chronique qui prend la forme d'une cardiomyopathie hypertrophique ou d'une cardiomyopathie ischémique. Cette toxicité apparaît 10 à 20 ans après l'administration de cette chimiothérapie. On constate aussi plus d'hypertension artérielle et d'accidents vasculaires cérébraux ainsi qu'une perturbation de l'agrégation plaquettaire chez les patients ayant été traités par cette molécule. Par ailleurs, le Cisplatine comme l'Ifosfamide possède une néphrotoxicité qui peut conduire au retard dans l'élimination de métabolites cardiotoxiques ou qui peut être responsable de troubles hydro électrolytiques potentiellement arythmogènes [99]. La Mitomycine C est peu utilisée actuellement mais elle possède une cardiotoxicité réelle. La description des 1^{ers} cas de toxicité cardiaque secondaire à l'administration de Mitomycine C remonte aux années 1970. Elle se manifeste essentiellement sous la forme d'insuffisance cardiaque et se manifeste plusieurs semaines après l'administration de multiples cycles de Mitomycine [112]. Elle est extrêmement sévère puisqu'elle conduit au décès du patient dans 25% des cas. Dans les microsomes, cette molécule est réduite en radical semi-quinone qui va subir une oxydation à l'intérieur des myocytes cardiaques. Il en résulte la production de radicaux superoxydes cardiotoxiques expliquant la synergie de cardiotoxicité entre les anthracyclines et la Mitomycine C [86, 112]. De plus, l'apparition d'une microangiopathie thrombotique associant anémie hémolytique, insuffisance rénale et hypertension artérielle est

une complication classique de l'administration de Mitomycine. Cette microangiopathie peut parfois conduire à une atteinte cardiaque.

I.3 – 2.d. Cardiotoxicité des taxanes

Le Paclitaxel qui fait partie de la famille des taxanes conduit essentiellement à l'apparition de bradycardie asymptomatique qui apparaît dans les heures suivant son administration et qui est spontanément résolutive [86, 91, 99]. Dans certains cas, cependant, il est nécessaire de recourir à l'implantation d'un pace-maker [101]. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette toxicité cardiaque. L'ingestion des feuilles d'if d'Europe, dont le Paclitaxel était initialement extrait, entraîne l'apparition d'un tableau clinique suraigüe associant des troubles du rythme et de la conduction. La fraction chimique toxique est la taxine B qui provoque des troubles de la conduction en agissant comme les anti-arythmiques de classe I ou IV [112]. Des similitudes de structure tridimensionnelle entre la taxine B et le Paclitaxel pourrait expliquer les troubles de la conduction engendrés. De plus, le crémosol EL qui est l'agent solubilisant du Paclitaxel conduirait à une réaction allergique qui augmenterait les besoins en oxygène du muscle cardiaque, favoriserait une vasoconstriction coronaire et aurait des effets chronotropes négatifs [112]. Il est aussi important de souligner que le Paclitaxel potentialise la cardiotoxicité des anthracyclines [86]. La chronologie dans la séance d'administration ainsi que l'intervalle de temps séparant l'administration de ces 2 types de molécules est à prendre en compte pour éviter ce phénomène. Le Paclitaxel par l'intermédiaire de son solvant diminuerait l'élimination des anthracyclines. Le crémosol EL inhiberait la p-glycoprotéine entraînant un phénomène de compétition au niveau de l'élimination biliaire et un ralentissement de l'élimination de la doxorubicine. Par ailleurs, il stimulerait la formation de Doxorubicinol dans le tissu cardiaque [112-114].

Les autres agents de chimiothérapie comme les poisons du fuseau et les modificateurs de l'ADN sont plus rarement à l'origine de complications cardiovasculaires.

I.3 – 3. La cardiotoxicité de l'hormonothérapie (tableau 1)

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hormonothérapie dans le cancer du sein repose essentiellement sur 2 types de molécules.

I.3 – 3.a. Cardiotoxicité du Tamoxifène

Le Tamoxifène initialement incriminé dans la survenue d'infarctus du myocarde, ne potentialiserait finalement pas ce risque [115, 116]. Cependant, il n'aurait pas non plus le rôle cardioprotecteur qui lui avait été attribué secondairement devant les modifications de certains paramètres inflammatoires et du profil lipidique qu'il entraînait [81, 83, 117-120]. En effet, le Tamoxifène conduit à une diminution de la CRP, du fibrinogène et même de l'homocystéine [117, 121]. Il agit comme un agent anti-agrégant plaquettaire par la diminution du calcium intra-plaquettaire qu'il engendre [99]. Il diminue les taux de cholestérol total, de LDL cholestérol, d'apolipoprotéine A1 et de lipoprotéine a (lpa) mais il semble augmenter le taux de triglycérides [83, 117, 122-124]. La prescription de Tamoxifène s'accompagne d'une augmentation de la survenue de thromboses veineuses profondes et d'embolies pulmonaires. Ces complications seraient secondaires à des modifications de la coagulation avec une diminution du taux d'antithrombine III et de protéine S [99]. Quant à l'implication du Tamoxifène dans la survenue d'accidents vasculaires cérébraux, elle n'a pas encore été clairement démontrée [116, 125].

I.3 – 3.b. Cardiotoxicité des anti-aromatases

Concernant les anti-aromatases les données des différentes études sont contradictoires et leur implication dans un sur-risque cardiovasculaire reste encore débattue [126]. Ces molécules seraient potentiellement à l'origine d'une augmentation des concentrations sériques de lipides et d'apolipoprotéines majorant le risque de nécrose myocardique [83, 117, 123, 127].

I.3 – 4. La cardiotoxicité des nouveaux traitements anticancéreux (tableau 1)

La cardiotoxicité des nouveaux médicaments anticancéreux concerne essentiellement 4 types de molécules. Nous ne détaillerons pas les spécificités de la toxicité cardiaque des différents composés, nous nous attacherons à rappeler les données cliniques les plus souvent rencontrées, en particulier, lorsqu'il s'agit d'associations avec les Anthracyclines.

I.3 – 4.a. Cardiotoxicité du Trastuzumab

Le Trastuzumab Herceptin®, prescrit dans le traitement du cancer du sein métastatique ou en situation adjuvante, est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'oncogène HER2. Lors des études précliniques chez l'animal ou lors des 1^{ères} études cliniques chez l'homme, aucun événement cardiaque n'avait été rapporté [92]. Or, il apparaît clairement de nos jours que cette molécule peut conduire au développement d'une cardiopathie [128, 129]. Elle se développe chez 1 à 7% des patientes ayant une monothérapie par Trastuzumab, chez 2 à 13% des patientes ayant une association Paclitaxel-Trastuzumab et chez plus de 27% des patientes traitées par une association Anthracycline-Cyclophosphamide-Trastuzumab [83, 129-132]. Le diagnostic de dysfonction cardiaque induite par la prescription du Trastuzumab est posé s'il existe l'un des 3 critères [86, 129]:

- diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) de 5% qui devient inférieure à 55% accompagnée de signes cliniques de défaillance cardiaque.
- diminution de la FEVG de 10% et qui devient inférieure à 55% asymptomatique.
- des signes fonctionnels cliniques de défaillance cardiaque ou l'apparition d'une cardiomyopathie caractérisée par la diminution de la FEVG globale ou septale.

En monothérapie, le risque de dysfonction cardiaque induite par le Trastuzumab est de l'ordre de 4%. Ce risque est largement majoré lors de l'association Trastuzumab-anthracycline comme s'il existait une additivité de leurs cardiotoxicités. Hormis l'association aux anthracyclines, un âge supérieur à 50 ans, une fraction d'éjection ventriculaire gauche subnormale avant traitement et des antécédents cardiovasculaires constituent des facteurs de risque de développement d'une cardiopathie au Trastuzumab. Les mécanismes physiopathologiques de la cardiotoxicité du Trastuzumab sont peu connus [133]. L'expression du récepteur HER2 à la surface des cellules est indispensable pour assurer un bon fonctionnement cardiaque [92]. Chez le fœtus, ces récepteurs sont présents en grande quantité au niveau du myocarde, ils permettent le bon développement du muscle cardiaque et des

valves [117]. Chez l'adulte, l'expression de ce récepteur à la surface des cellules myocardiques est faible, tout comme l'expression de son ARNm. Il semblerait que tout stress biochimique exercé sur le myocarde, comme l'administration d'anthracycline, stimule l'expression de HER2 à la surface des myocytes. En fait, les contraintes exercées au niveau du tissu cardiaque entraîneraient l'expression d'un peptide, la neureguline qui activerait HER2 en induisant sa phosphorylation, conduisant à l'inhibition de l'apoptose et la promotion de la prolifération cellulaire [117, 129]. Le Trastuzumab, en se fixant sur ces récepteurs, inhiberait cette action et modulerait en plus l'expression de protéines telles que BCL-XL et BCL-XS [93, 133]. Ces protéines jouent un rôle dans l'apoptose cellulaire, BCL-XL comme facteur anti-apoptotique et BCL-XS comme facteur pro-apoptotique [134]. Cette fixation du Trastuzumab sur HER2, modifierait aussi les voies de signalisation AKT et NF-KB qui jouent un rôle important dans la survie des cellules soumises à différentes agressions [128]. Il en résulterait une dysfonction mitochondriale, une diminution de la production d'adénosine triphosphate et l'activation du programme apoptotique. Une autre hypothèse concernant la physiopathologie de l'atteinte cardiaque par le Trastuzumab reposerait sur une cytotoxicité anticorps dépendante [128]. En effet, le Lapatinib, petite molécule anti-tyrosine Kinase, inhibe l'action du facteur de croissance qui se fixe sur HER2 mais ne possède qu'une faible cardiotoxicité au regard de celle induite par le Trastuzumab [92, 133]. Au niveau histologique, en microscopie électronique, cette atteinte cardiaque se traduit par une hypertrophie des myocytes, l'apparition d'une fibrose interstitielle et une vacuolisation cellulaire focale, toutes ces constatations étant aspécifiques. A noter que, contrairement à la cardiotoxicité des anthracyclines, la myocardiopathie induite par l'administration de Trastuzumab ne semble pas être dose dépendante et apparaît partiellement réversible à l'arrêt du traitement avec ou sans prescription de médicaments de l'insuffisance cardiaque [126, 132-135]. Par ailleurs, il semblerait que la reprise du Trastuzumab après la récupération d'une fonction cardiaque normale n'induit pas forcément une nouvelle dégradation de la fonction cardiaque et l'apparition d'un tableau clinique d'insuffisance cardiaque.

I.3 – 4.b. Cardiotoxicité de l'immunothérapie

L'immunothérapie est le 2^{ème} groupe de thérapeutiques anticancéreuses potentiellement responsable d'une atteinte cardiovasculaire.

- En effet, lors des 1^{ers} essais thérapeutiques de l'Interféron, les doses utilisées étaient importantes et conduisaient à des effets indésirables précoces en particulier des collapsus et des arythmies cardiaques [91]. La diminution des posologies a permis d'améliorer la tolérance

de l'Interféron. Cependant, bien que rares, la littérature rapporte encore différentes atteintes cardiaques secondaires à l'administration d'Interféron même à plus faibles doses [112]. Ainsi, on retrouve des arythmies supra-ventriculaires qui représentent la manifestation cardiaque la plus fréquente mais aussi, des troubles du rythme ventriculaire, des ischémies myocardiques, des spasmes coronaires voire de véritables infarctus du myocarde, des troubles conductifs et de rares cas de décompensation cardiaque ou d'hypertension artérielle [86, 99, 136]. Aucun effet cytopathogène direct de l'Interféron sur le myocarde n'a, cependant, encore été mis en évidence. Si la cardiotoxicité de l'interféron reste rare, l'existence d'une cardiopathie sous-jacente devra tout de même bien faire peser l'indication de ce traitement et le débiter s'il est nécessaire à plus faible dose. Il est important de ne pas méconnaître les différents types de cardiotoxicité de l'Interféron car la plupart d'entre elles sont réversibles à l'arrêt du traitement [86].

- L'interleukine 2 Proleukin® peut être à l'origine d'un syndrome de fuite capillaire précoce avec une chute de l'ordre de 40% des résistances artérielles périphériques, une augmentation de la perméabilité capillaire et une baisse de la pression artérielle moyenne de l'ordre de 20% [70, 86, 91, 99, 135]. On observe alors une augmentation de la fréquence cardiaque et de l'index cardiaque [112]. On peut, par ailleurs, assister à l'apparition de troubles du rythme essentiellement supra-ventriculaires, d'une ischémie myocardique et de myocardites. [86] Toutes ces manifestations doivent conduire à l'arrêt du traitement. Les complications hémodynamiques et cardiovasculaires sont les causes les plus fréquentes de modification ou d'arrêt de l'interleukine 2. La recherche préalable d'une cardiopathie ischémique ou de troubles du rythme est indispensable avant l'introduction d'un traitement par Interleukine 2.

I.3 – 4.c. Cardiotoxicité des anti-tyrosine kinases

Les anti-tyrosine kinases inhibent ces enzymes dans les tissus tumoraux mais aussi dans les tissus sains ce qui explique leurs effets secondaires [130, 132]. On divise cette toxicité en 2 groupes appelés « on-target toxicity » et « off-target toxicity » [75]. Dans le 1^{er} cas, la tyrosine kinase cible du traitement anti-cancéreux est impliquée dans le bon fonctionnement cardiaque et son inhibition conduit à des effets délétères cardiovasculaires comme c'est le cas pour l'Imatinib. Dans le second cas, l'anti-tyrosine kinase en plus d'inhiber la tyrosine kinase cible, inhibe une autre kinase importante pour le bon fonctionnement cardiaque comme c'est le cas pour le Sunitinib qui inhibe plus de 50 kinases [137]. La cardiotoxicité de ces molécules semble peu fréquente par rapport aux chimiothérapies anticancéreuses mais probablement

sous estimée du fait du peu de recul concernant leur utilisation. De plus, la co-prescription d'autres agents anticancéreux induit un biais dans l'évaluation de leur cardiotoxicité. Le spectre de l'atteinte cardiaque secondaire à ces molécules est large allant de l'allongement asymptomatique du QT au syndrome coronarien aigu en passant par l'insuffisance cardiaque et l'hypertension artérielle [138]. Toutes ces petites molécules anti-tyrosine kinases n'ont pas la même cardiotoxicité. Ce n'est donc pas un effet de classe médicamenteuse. Par ailleurs, cette atteinte cardiaque n'est pas proportionnelle au niveau d'expression des tyrosine kinases dans les cardiomyocytes. L'Imatinib prescrit dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique peut être à l'origine d'une cardiomyopathie sévère avec altération majeure de la fonction cardiaque. En plus des phénomènes apoptotiques, on assiste alors aussi à une nécrose myocytaire par manque d'énergie nécessaire pour l'apoptose. Cependant, cette perte de myocytes ne peut expliquer à elle seule l'atteinte cardiaque observée car cette dernière est souvent partiellement réversible. Le dysfonctionnement observé dans la production d'énergie de ces cellules participerait à l'altération de la fonction cardiaque et expliquerait sa réversibilité à l'arrêt du traitement.

Le Danatinib et le Nilotinib, autres anti-tyrosine kinases, seraient à l'origine d'allongements asymptomatiques du QT, d'arythmies voire de réactions péricardiques. Le Sunitinib, quant lui, serait pourvoyeur d'une cardiotoxicité non négligeable associée à une importante morbidité. La prescription de cette molécule doit être prudente et ce d'autant plus que les patients présentent des antécédents cardiaques, des facteurs de risque cardiovasculaire ou la co-prescription d'autres molécules cardiotoxiques [137]. Cette atteinte cardiaque n'apparaît que plusieurs mois après l'introduction du traitement et semble réversible à l'arrêt de celui-ci. Elle se manifeste essentiellement par une insuffisance cardiaque et on constate les mêmes anomalies que celles induites par l'Imatinib lors de l'étude histologique du tissu cardiaque. D'autres inhibiteurs des tyrosine kinases comme le Sorafenid peuvent conduire à une atteinte cardiovasculaire contrairement au Gefitinib et à l'Erlotinib pour lesquels aucun cas de cardiotoxicité n'a été répertorié.

I.3 – 4.d. Cardiotoxicité des traitements anti-angiogéniques

L'hypertension artérielle représente la principale atteinte cardiovasculaire secondaire à la prescription d'un traitement anti-angiogénique comme le Bevacizumab [133]. Dans les différentes études cliniques réalisées, 4 à 35% des patients traités par Bevacizumab ont développé une hypertension artérielle qu'elle que soit son grade. Dans la majorité des cas, l'introduction d'un traitement antihypertenseur permettait la normalisation des chiffres

tensionnels et la poursuite du Bevacizumab. Dans d'autres cas cependant, une interruption du traitement était nécessaire devant l'absence de normalisation de la pression artérielle sous traitement ou l'apparition de complications comme une encéphalopathie hypertensive ou une hémorragie intra-cérébrale [135]. Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de cette hypertension ne sont pas complètement élucidés. Ils feraient intervenir l'inhibition du récepteur du VEGF. Cela entraînerait une diminution de la production de NO par la NO synthase endothéliale conduisant à une augmentation des résistances vasculaires et à l'installation d'une hypertension artérielle. Par ailleurs, ce processus serait mis en jeu dans la stimulation de l'expression du Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) majorant le risque d'hypertension artérielle. L'implication du système rénine-angiotensine-aldostérone dans la genèse de cette hypertension a été évoquée mais il semblerait que les taux sériques de rénine, d'aldostérone tout comme ceux des catécholamines ne soient pas modifiés. Des tableaux cliniques d'insuffisance cardiaque ont été décrits sous Bevacizumab [75, 101, 133]. Il est bien connu par ailleurs que le VEGF est impliqué dans la prolifération et la survie des cellules endothéliales mais aussi dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium. Les traitements anti-VEGF diminuent donc les capacités de régénérescence des cellules endothéliales en réponse aux différents traumatismes. Cela entraînent l'exposition du facteur tissulaire et du collagène sous endothélial, qui ne possèdent pas de propriétés anti-agrégantes, au flux sanguin. Il en résulte une majoration du risque thrombotique [101].

Tableau 1: Cardiotoxicités des traitements anticancéreux hors radiothérapie adapté de Senkus *et al.*[99].

Molécules	Cardiotoxicité
Anthracyclines	
Doxorubicine	Insuffisance cardiaque / Dysfonction ventriculaire gauche
Daunorubicine	
Epirubicine	
Idarubicine	
Antimétabolites	
5-FU	Ischémie myocardique
Agents alkylants	
Cyclophosphamide	Insuffisance cardiaque / Péricardite / Myocardite
Ifosfamide	Insuffisance cardiaque Trouble du rythme
Cisplatine	Hypertension artérielle Insuffisance cardiaque / Ischémie myocardique
Mitomycine C	Insuffisance cardiaque
Taxanes	
Paclitaxel	Troubles du rythme et de la conduction Hypotension Insuffisance cardiaque
Tamoxifène	Complications thromboemboliques
Anti-aromatases	Ischémie myocardique?
Trastuzumab	Insuffisance cardiaque / Dysfonction ventriculaire gauche
Immunothérapie	
Interféron	Hypotension / Hypertension artérielle Troubles du rythme Ischémie myocardique / Dysfonction ventriculaire gauche
Interleukine-2	Hypotension / Ischémie myocardique Troubles du rythme
Anti-tyrosine kinases	
Imatinib	Œdème / Effusion péricardique Insuffisance cardiaque
Sunitinib	Hypertension artérielle Allongement du QT Insuffisance cardiaque
Anti-angiogéniques	
Bevacizumab	Hypertension artérielle Insuffisance cardiaque Complications thromboemboliques

I. 4.- Rôle et prévention du stress oxydant dans la cardiotoxicité des Anthracyclines

I. 4– 1. Place du stress oxydant dans la cardiotoxicité des Anthracyclines

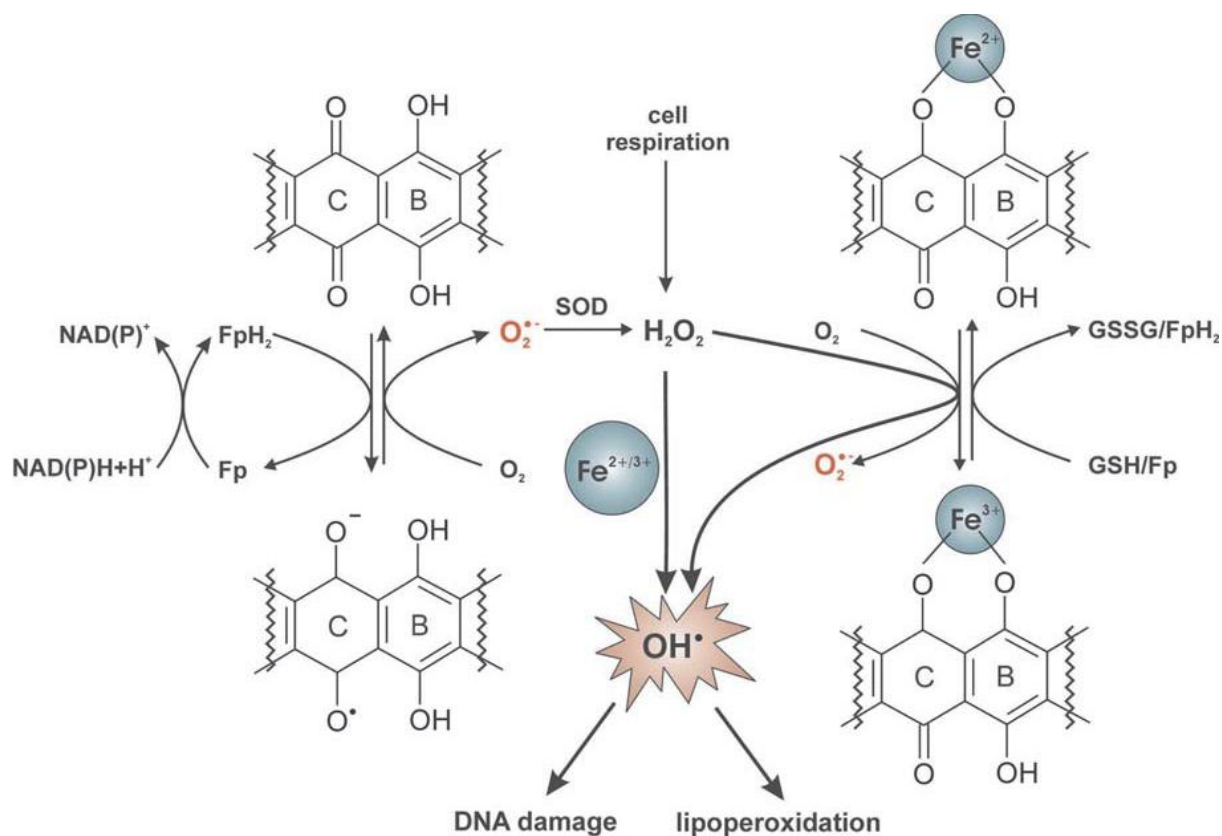
Bien que les mécanismes mis en jeu dans cette toxicité ne soient pas totalement élucidés, il est maintenant admis que la cardiotoxicité des Anthracyclines repose essentiellement sur une majoration d'un processus oxydatif mettant en jeu la production d'espèces radicalaires [102, 106]. La présence, dans l'organisme, d'une quantité limitée de radicaux libres de l'oxygène est indispensable [139]. Ils participent aux voies de signalisation impliquées dans la croissance, la protection, la différenciation et la mort cellulaire. Cependant, une surproduction de ces espèces radicalaires joue un rôle important dans le vieillissement, les phénomènes ischémiques et tumoraux ainsi que dans les désordres immunitaires et endocriniens. L'implication du stress oxydant dans la cardiotoxicité des Anthracyclines a été confirmée par l'étude de la 5-iminodaunorubicin. Cette molécule, non commercialisée du fait de sa myélotoxicité, fait partie de la famille des Anthracyclines mais possède une structure chimique différente des autres composés de cette classe. En effet, ses fractions quinones sont remplacées par des groupements imines. Il en résulte une réduction de l'ampleur des lésions myocardiques qui serait liée à une diminution de la production d'espèces oxydantes [140].

La 1^{ère} cible des radicaux libres générés par les Anthracyclines est la mitochondrie [141]. C'est aussi à son niveau qu'on assiste à la production d'une grande partie des espèces radicalaires du fait de la très grande affinité des Anthracyclines pour la cardiolipine retrouvée au niveau de la membrane mitochondriale interne [105]. La production mitochondriale d'espèces radicalaires est confirmée par l'administration d'un antioxydant qui agit au niveau de la mitochondrie: le Mito-Q. Il se conduit alors comme un agent cardioprotecteur.

Différentes voies participent à la production de radicaux libres par les Anthracyclines car ce sont des molécules extrêmement réactives. Elles appartiennent au groupe des antibiotiques dérivant d'un bacille: l'*Actinomycete Streptomyces* [86]. Elles possèdent une partie chromophore composée de 4 anneaux aromatiques et sont constituées de fractions quinones et hydroquinones. Les fractions quinones peuvent être réduites en semi-quinones sous l'action des NADPH oxydoréductases [142]. Ces composés semi-quinones peuvent ensuite être recyclés en quinones par réduction de l'oxygène. Cela conduit à la formation de radicaux libres de l'oxygène tels que l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et de l'hydroxyle OH^{\cdot} [143]. A noter que les activités et l'expression des NADPH oxydases, localisées au niveau du myocarde, augmentent en cas de décompensation cardiaque, amplifiant la production de radicaux libres.

D'autres mécanismes mis en jeu lors du traitement par les Anthracyclines interviennent dans la production radicalaire. Le 1^{er} fait intervenir le fer. Sous l'action des Anthracyclines, l'ion ferrique se détache de ses sites de stockage et vient s'associer à 3 molécules d'Anthracycline. Le complexe ainsi formé peut subir des réactions d'oxydoréduction internes et amplifier la production de radicaux libres de l'oxygène. Ce phénomène est auto-entretenu car le stress oxydant induit l'activation de protéines de régulation du métabolisme du fer IRP (Iron-Regulatory protein) qui interagissent avec des récepteurs IRE (Iron Responsive Element) situés sur l'ARN messager du récepteur de la transferrine. Il en résulte une augmentation de l'expression du récepteur de la transferrine et une accumulation d'ions ferriques dans la cellule qui peuvent à nouveau fixer 3 molécules d'Anthracycline. Par ailleurs, il a été montré expérimentalement que les fractions hydroquinones des Anthracyclines pouvaient subir des peroxydations qui entraîneraient la formation de quinones électrophiles très réactives [140].

Schéma 3: Production d'espèces radicalaires par les Anthracyclines d'après Simunek *et al.* [102]. $O_2^{\cdot-}$: radical superoxyde, SOD: superoxyde dismutase, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, OH^{\cdot} : radical hydroxyle, NAD(P): nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate), Fp: flavoprotéine, GSH/GSSG: forme réduite et oxydée du glutathion.



Cette surproduction de radicaux libres induit au niveau de toutes les structures cellulaires une augmentation de la peroxydation lipidique qui conduit à une altération des fonctions membranaires. Des anomalies de la perméabilité membranaire apparaissent dont les conséquences sur l'homéostasie ionique sont multiples. Les perturbations du flux calcique qui en découlent, altèrent la contractilité myocardique. En plus des modifications architecturales et fonctionnelles des membranes cellulaires, le stress oxydant participe aussi à un remodelage de la matrice extracellulaire [142].

Les lésions mitochondriales induites par le stress oxydant participent à l'initiation de processus apoptotiques. Les radicaux libres déclenchent la libération, à partir de la mitochondrie, du cytochrome *c* qui active les caspases [94]. Cette activation joue un rôle majeur dans les voies de signalisation de l'apoptose cellulaire. Par ailleurs, la majoration du stress oxydant participe à l'activation de différentes voies de kinases comme les MAP kinases (mitogen-activated protein kinase) ou les SAP kinases (stress-activated protein kinase) qui ont toutes les 2 un rôle dans l'apoptose cellulaire. Le processus oxydatif se poursuit bien après l'arrêt du traitement par anthracyclines, expliquant l'apparition retardée de la cardiomyopathie dilatée induite par ces molécules.

On assiste par ailleurs, sous l'action des Anthracyclines, à une augmentation de l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) ainsi que de son ARN messager au niveau du muscle cardiaque [97, 144]. Le NO diffuse facilement au travers des membranes et des différents compartiments cellulaires ce qui permet son interaction avec l'anion superoxyde. La réaction entre l'anion superoxyde et le NO, produit en grande quantité, conduit à la formation de peroxynitrites (ONOO⁻) au niveau des différentes structures cellulaires. Ces peroxynitrites produisent des dommages cellulaires qui majorent les altérations initialement induites par les formes radicalaires oxygénées: peroxydations lipidiques, inactivation d'enzymes, inactivation de certaines protéines intervenant dans la contractilité cardiaque ou dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

Le cœur est naturellement protégé par différents éléments constitutifs anti-radicalaires de type vitaminique (vitamine E, A, C, acide folique) et protéique (enzymes de détoxification: SODs, catalases, glutathion peroxydases) [145]. En plus de la surproduction de radicaux libres, l'équilibre espèces oxydantes-espèce antioxydantes est perturbé par une déplétion des enzymes antioxydantes induite par les Anthracyclines. Ainsi, sous l'action des Anthracyclines, on assiste à une diminution des taux de superoxyde dismutases et de glutathion peroxydases au niveau du tissu cardiaque.

Outre l'action des Anthracyclines, les statuts oxydant et antioxydant des patients porteurs d'une néoplasie sont perturbés [146, 147]. Ces perturbations sont retrouvées aussi bien au niveau du tissu tumoral qu'au niveau plasmatique. Il est maintenant admis qu'au cours de l'évolution d'un cancer, situation associée à l'installation d'un état inflammatoire chronique, on assiste à une augmentation de la production de radicaux libres de l'oxygène, à une augmentation de la production de certaines espèces antioxydantes dans le but de contrecarrer cette majoration du stress oxydant et, à l'inverse, une diminution du taux d'autres substances antioxydantes par consommation, défaut d'apport ou défaut de production. Ce déséquilibre entre les substances oxydantes et antioxydantes au bénéfice des radicaux libres, participe à l'initiation et la promotion du processus tumoral ainsi qu'à sa diffusion métastatique. On retrouve, par exemple, une diminution du taux circulant d'acide ascorbique au cours du cancer du sein qui entraîne une diminution de la synthèse de collagène et donc du tissu conjonctif. Il en résulte une perte de l'intégrité de la matrice extracellulaire qui pourrait participer à l'initiation et au développement de la croissance tumorale.

I.4 – 2. Prévention de la cardiotoxicité des Anthracyclines

Initialement, la cardiotoxicité chronique des anthracyclines était considérée comme irréversible, le pronostic apparaissait donc sombre. Deux voies de recherche ont été développées pour lutter contre cette cardiotoxicité. L'une ayant comme objectif de prévenir son apparition et l'autre ayant pour but de traiter cette cardiomyopathie.

Dans le cadre de la prévention et avant toute nouvelle intervention thérapeutique, il apparaît impératif de respecter les contre-indications cardiaques à l'administration d'anthracyclines. Ces contre-indications font partie des recommandations de la Société Française de Cardiologie. En cas de FEVG inférieure à 35%, l'administration d'anthracyclines est contre-indiquée. Si la FEVG est comprise entre 35 et 50%, il est recommandé d'évaluer la FEVG après chaque cure et d'arrêter le traitement si elle diminue de plus de 10% ou si elle devient inférieure à 30%. Enfin, si la FEVG est supérieure ou égale à 50%, une seconde évaluation devra être réalisée à la dose de 250-300mg/m² d'anthracycline et, en fonction des facteurs de risque, une 3^{ème} évaluation à 400-450 mg/m² puis après chaque dose avec arrêt du traitement si la FEVG chute de plus de 10% et devient inférieure à 50%. Par ailleurs, afin de limiter le développement de cette cardiomyopathie, il faut tenter de corriger les facteurs de risque cardiovasculaire du patient.

Différentes voies ont été explorées afin de réduire cette cardiotoxicité [94, 95, 97]. Elles reposent sur la modification des schémas d'administration, la réduction de la dose cumulative administrée, l'utilisation d'analogues des anthracyclines, l'administration de molécules cardioprotectrices parfois sous la forme de compléments alimentaires [54].

I.4 – 2.a. Chronologie d'administration

Différents travaux ont porté sur la chronologie d'administration des anthracyclines. Initialement, il avait été décrit une diminution significative de l'incidence de la cardiomyopathie aux anthracyclines si leur administration était hebdomadaire et non toutes les 3 semaines. Dans des études plus récentes, aucune différence significative n'a été retrouvée dans l'apparition de cette cardiotoxicité en fonction du schéma d'administration. De même, l'intérêt de l'administration continue d'Anthracyclines par rapport à la réalisation de bolus reste controversé. En effet, l'administration continue permet de diminuer les pics sanguins d'Anthracyclines mais conduit à une exposition plus longue à ces molécules. Plusieurs études, montrent que la cardiotoxicité des Anthracyclines ne semble pas prévenue par une infusion continue.

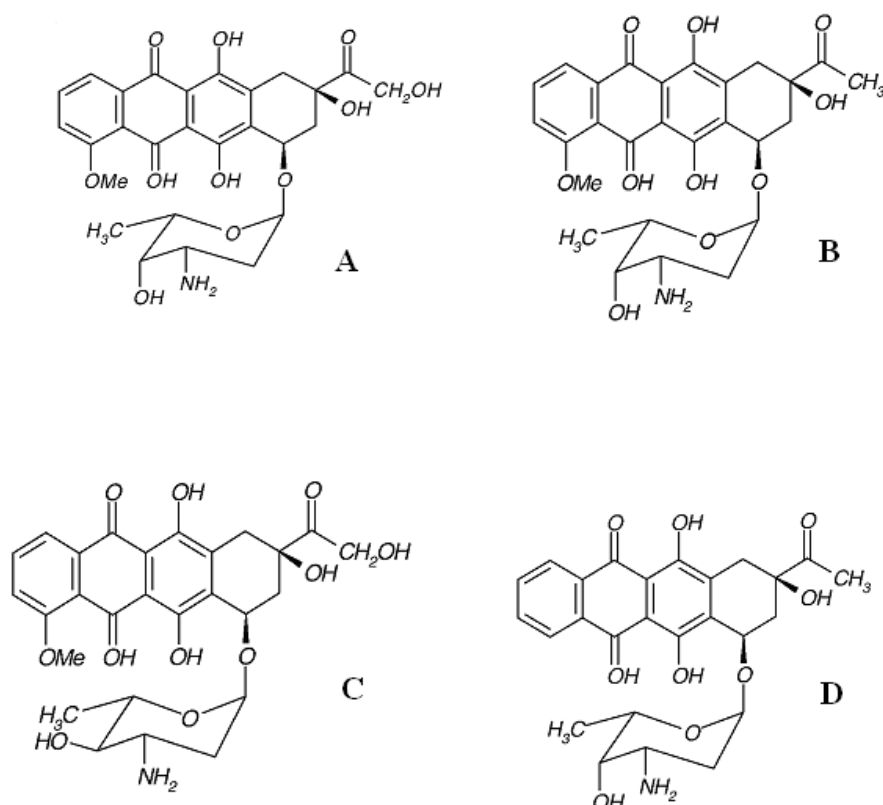
I.4 – 2.b. Nouvelles Anthracyclines et formes galéniques

Afin de limiter la cardiotoxicité de la Doxorubicine et de la Daunorubicine, de nouvelles molécules de la famille des anthracyclines ont été développées [54, 106]. Certaines comme la Carminomycine, l'Esorubicin, la Quelamycine n'ont pas montré d'avantage par rapport à la Doxorubicine en termes d'altération de la fonction cardiaque [94]. D'autres, comme c'est le cas pour l'Epirubicine ont fait la preuve de leur intérêt et ont été commercialisées. En effet, l'Epirubicine possède une activité anti-tumorale identique à celle de la Doxorubicine mais présente une toxicité cardiaque moindre. Cela permet l'utilisation de plus fortes doses et donc l'optimisation du traitement anticancéreux. En effet, la dose cumulative à ne pas dépasser pour l'Epirubicine est de l'ordre de 900-1000 mg/m² alors qu'elle n'est que de 400-500 mg/m² pour la Doxorubicine. Cependant, ces limites de doses ne sont que théoriques et on peut voir apparaître une cardiotoxicité même à des plus faibles doses. D'autres molécules comme l'Idarubicine ont été développées dans la lignée de l'Epirubicine (schéma 4).

Plusieurs équipes ont axé leur recherche sur la galénique des anthracyclines. Trois formes liposomales sont actuellement sur la marché: la Daunorubicine liposomale, la Doxorubicine liposomale et la Doxorubicine liposomale pégylée [106]. Ces formes liposomales permettent d'augmenter les concentrations plasmatiques d'anthracyclines et d'avoir une administration

plus ciblée au niveau de la tumeur [87]. En effet, l'administration intraveineuse de liposomes empêche leur extravasation au niveau de tissus ayant des jonctions capillaires serrées comme le cœur ou le tractus digestif. Ils peuvent sortir de la circulation et pénétrer dans les tissus si les jonctions capillaires sont plus lâches ou s'il existe une interruption au niveau des capillaires comme cela est le cas lors de la croissance tumorale. Grâce aux liposomes, des organes comme le cœur se trouvent moins exposés aux Anthracyclines. Cela permet aussi un délitement plus long qui conduit à un pic plasmatique moins important. A noter que la Doxorubicine liposomale pégylée (polyethylene glycol-coated) a une demi-vie plus longue par rapport aux 2 autres formes du fait de son revêtement qui diminue sa phagocytose par les monocytes macrophages. Ces 3 formes liposomales diminuent le développement d'une cardiomyopathie aux anthracyclines sans pour autant diminuer ou augmenter la réponse anti-tumorale, le taux de rémission ou la survie sans récurrence du cancer. Parallèlement à l'évaluation clinique, des études histologiques ont été réalisées. Elles retrouvent une altération du tissu myocardique moindre lors de l'utilisation de formes liposomales. Le point d'ombre qui persiste est la dose cumulative de ces formes à ne pas dépasser au risque de conduire à une cardiomyopathie dilatée toxique.

Schéma 4: Formules chimiques des Anthracyclines. (A) Doxorubicine, (B) Daunorubicine, (C) Epirubicine, (D) Idarubicine d'après Kizek *et al.*[148].



I.4 – 2.c. Protection pharmacologique

Afin de réduire la cardiotoxicité des anthracyclines, différentes molécules ont été testées (tableau 2) [93, 103]. Il apparaît indispensable qu'elles n'interfèrent pas avec l'activité anti tumorale et l'efficacité des anthracyclines. La seule dont l'utilisation soit actuellement reconnue est le Dexrazoxane. Cet agent, via son métabolite l'ADR-925 diminue la production et piègent les radicaux libres de l'oxygène [83, 149]. Il diffuse à l'intérieur de la cellule où il est hydrolysé. C'est sous cette forme hydrolysée qu'il va soit détacher le fer du complexe fer-anthracycline soit fixer le fer libre empêchant alors la formation de radicaux libres de l'oxygène. Par ailleurs, les anthracyclines par l'intermédiaire des radicaux libres vont stimuler l'activité transcriptionnelle de NF-κB qui participe à l'apoptose cellulaire. Le Dexrazoxane inhibe la dégradation d'IκB, or, l'IκB empêche la fixation de NF-κB sur ses cibles transcriptionnelles et limite ainsi l'apoptose des myocytes. Le Dexrazoxane interviendrait aussi en empêchant l'interaction entre les Anthracyclines et les topoisomérases, en particulier 2β [98]. Cependant, il ne serait pas spécifique de cette isoforme ce qui expliquerait que les résultats des différentes études réalisées sur l'impact du Dexrazoxane sur la réponse anti-tumorale, la survie sans événement et la survie globale restent controversés [92, 117, 150, 151]. Il n'en demeure pas moins que le Dexrazoxane diminuerait la survenue d'évènements cardiaques et permettrait d'augmenter les doses d'Anthracycline utilisées. Actuellement, les indications reconnues pour sa prescription sont les suivantes: traitement du cancer du sein métastatique chez des patients ayant reçu 300mg/m² de Doxorubicine ou traitement de tout autre cancer chez des patients ayant reçu 300mg/m² de Doxorubicin [91]. Aucune recommandation n'existe sur son utilisation en onco-pédiatrie, malgré la réalisation de différentes études [152-154], ou lors de l'administration d'anthracyclines autre que la Doxorubicine [155].

D'autres molécules ont été évaluées afin de limiter la cardiotoxicité des Anthracyclines. Ces molécules antioxydantes peuvent être classées en 3 catégories: celles qui piègent les radicaux libres, celles qui empêchent leur formation ou encore celles qui augmentent le taux d'antioxydants.

- Parmi les substances qui neutralisent les radicaux libres, on retrouve l'Amifostine. Cet agent cytoprotecteur possède un spectre d'action très large [156]. Il semble limiter la myélo, la neuro et la néphrotoxicité induites par différentes chimiothérapies. Au niveau cardiaque, plusieurs études conduites chez l'animal ont montré qu'il piègeait le radical

hydroxyle et limitait l'atteinte cardiaque. Cependant, aucune étude contrôlée randomisée n'a été réalisée chez l'homme.

- Les molécules évaluées pour leur capacité à promouvoir la synthèse d'antioxydants sont nombreuses. Parmi elles, on retrouve le Probucol. En plus d'augmenter l'activité de la superoxyde dismutase et d'empêcher la diminution de celle de la glutathion peroxydase sous l'influence des anthracyclines, il possède un effet hypolipémiant bénéfique [157-159]. Malheureusement, bien que prometteur chez l'animal, le Probucol n'a pas montré son efficacité chez l'homme dans la prévention de la cardiomyopathie induite par les anthracyclines. La N-acétylcystéine, connue pour ces propriétés fluidifiantes bronchiques, possède elle aussi une activité anti-oxydante passant par la synthèse de glutathion. Cependant, là encore, les études réalisées chez l'homme n'ont pas confirmé son rôle cardioprotecteur face aux Anthracyclines [160, 161].

- Certains agents pharmacologiques, comme le Carvédilol, interfèrent avec le niveau de stress oxydant de plusieurs façons. Le Carvédilol diminue la production de radicaux libres de l'oxygène, limite la déplétion en antioxydants tels que la vitamine E ou le glutathion et prévient la peroxydation lipidique [162]. Par ailleurs, il réduit l'apoptose cellulaire [163, 164]. L'action du Carvédilol sur le stress oxydant passe par son action au niveau de la perméabilité du pore de transition mitochondrial et au niveau des NADH déshydrogénases aussi connu comme le Complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale. Chez l'homme, quelques études de petite envergure ont rapporté une diminution des effets cardiotoxiques des anthracyclines [165]. Dans des études récentes, le Telmisartan, un antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II, semblerait posséder une action cardioprotectrice vis-à-vis des Anthracyclines [166-168]. Son action serait médiée par une diminution de la production de radicaux libres évaluée par le test FORT. Par contre, il n'empêcherait pas la diminution du taux d'antioxydants induit par les Anthracyclines. Le Telmisartan modulerait aussi l'activité des PPAR- γ qui ont une activité anti-inflammatoire, anti-oxydante et anti-proliférante au niveau des cellules endothéliales. Là encore, ces données méritent d'être confortées par des études de plus grande envergure.

- Afin de limiter la cardiotoxicité des Anthracyclines une approche plus nutritionnelle a été proposée [169]. Elle repose sur l'apport alimentaire d'agents antioxydants ou de molécules conduisant à la production intrinsèque d'antioxydants. L'objectif est de rétablir un équilibre dans la balance agents oxydants / agents antioxydants au sein de l'organisme. Cet axe de recherche s'est développé dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires qui ont en commun l'apparition d'une dysfonction endothéliale faisant intervenir le stress oxydant. Afin

de caractériser le pouvoir antioxydant d'une molécule, différents paramètres doivent être analysés. Nous avons pris l'exemple de l'acide alpha-lipoïque pour illustrer notre propos [170, 171]. Cependant, bien que prometteurs chez l'animal, différentes vitamines comme la vitamine A et plus particulièrement le rétinol, la vitamine E dont l' α tocophérol, la vitamine C mais aussi le coenzyme Q10, le sélénium et la carnitine, aucun de ces antioxydants n'a démontré son efficacité dans la pratique clinique [160, 172-176].

- Le versant inflammatoire de l'insuffisance cardiaque a aussi été investigué. En effet, les anthracyclines conduisent à l'expression de l'isoforme inductible COX2 de la cyclooxygénase au niveau du myocarde. Cette enzyme est essentiellement présente dans le myocarde ischémique ou dans les cardiomyopathies dilatées [103]. Sa production participe à l'altération des cardiomyocytes [177]. Plusieurs études ont étudiées, chez l'animal, l'intérêt d'un traitement préventif par Iloprost qui est un analogue des prostaglandines PGI2 afin de limiter cette cardiotoxicité. Les résultats semblent probants chez l'animal mais demandent à être confirmés chez l'homme.

En ce qui concerne le traitement de la cardiomyopathie chronique induite par les anthracyclines lorsque celle-ci est installée, il repose sur celui de l'insuffisance cardiaque [95, 106, 135]. En plus des règles hygiéno-diététiques à respecter, de nombreuses études ont étudié l'impact d'un traitement par inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et par bêta bloquants de l'insuffisance cardiaque lors de l'atteinte du tissu myocardique par les anthracyclines [178]. Il apparaît que les IEC, tout comme les bêta bloquants, permettent d'obtenir une amélioration de la fonction cardiaque avec parfois même, un retour à une FEVG sub-normale voire normale [95]. Les IEC agissent en diminuant les résistances vasculaires périphériques et la consommation en oxygène du myocarde. Ils augmentent le débit cardiaque et limitent voire préviennent le remodelage ventriculaire. Un travail récent a montré l'efficacité très précoce, avant la dégradation des paramètres échocardiographiques, des IEC dans le traitement de cette cardiopathie aux Anthracyclines [179]. Cependant, certaines études ont montré que cette amélioration sous IEC ne serait que transitoire et que l'évolution serait inéluctable vers une insuffisance cardiaque terminale [180]. Des études prospectives plus puissantes en termes statistiques sont donc nécessaires. Les bêta bloquants, quant à eux, interviennent sur le remodelage ventriculaire et contrecarrent la réaction adrénérgique induite par la dysfonction myocardique induite par les Anthracyclines. Une étroite collaboration entre oncologues et cardiologues est nécessaire pour l'introduction de ces thérapeutiques et le suivi, en particulier échocardiographique, de ces patients [88, 181]. Associés à ces traitements qui ont fait leur preuve en termes de réduction de mortalité dans l'insuffisance cardiaque, d'autres

thérapeutiques sont utilisées dans le but de diminuer les symptômes et réduire le nombre d'hospitalisations. Parmi elles, on retrouve les diurétiques et les digitaliques. A un autre niveau, en cas d'insuffisance cardiaque réfractaire, on peut avoir recours aux amines inotropes positives, aux dispositifs d'assistance cardiaque voire à la transplantation cardiaque sous réserve d'un cancer en rémission [182].

Tableau 2: Molécules testées dans la protection de la cardiotoxicité des Anthracyclines adapté de Wouters *et al.*[94].

Agent	Classe ou action thérapeutique	Mécanisme d'action
Dexrazoxane	Chélateur	Prévient la formation de radicaux libres, inhibe les topoisomérases, se fixe sur le fer
Amifostine	Cytoprotecteur	Chélateur de radicaux libres
Probucol	Hypolipémiant	Stimule la synthèse endogène d'antioxydants
N-acétylcystéine	Mucolytique	Stimule la synthèse endogène d'antioxydants
Carvedilol	Antagoniste β adrénergique	Prévient la formation de radicaux libres et la déplétion en antioxydants endogènes
Telmisartan	Antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II	Prévient la formation de radicaux libres
Vitamine A, C, E	Nutriments	Antioxydant
Coenzyme Q10	Complément alimentaire	Antioxydant
Sélénium	Oligo-élément	Antioxydant, anti-cancérigène
Carnitine	Complément alimentaire	Antioxydant
Iloprost	Analogue des prostaglandines I2	Prévient la formation de radicaux libres, vasodilatateur, antiagrégant

I. 5.- Objectifs

Tous les traitements anticancéreux, en dehors de la chirurgie, peuvent avoir un retentissement cardiovasculaire plus ou moins important. Malgré le développement des nouveaux médicaments anticancéreux, la radiothérapie et la chimiothérapie gardent une place privilégiée dans la stratégie thérapeutique proposée à ces patients. Le perfectionnement des techniques d'irradiation a permis de diminuer considérablement la cardiotoxicité radio-induite contrairement au domaine de la chimiothérapie où l'avancée des progrès est plus lente. Comme nous l'avons vu précédemment, les mécanismes de l'atteinte cardiaque secondaire à ces agents, et en particulier aux Anthracyclines, sont multiples et intriqués ce qui rend les travaux de recherche difficiles. Aussi, dans un 1^{er} temps expérimental, nous avons tenté de reproduire un modèle de cardiotoxicité chronique aux Anthracyclines et d'en limiter le développement grâce à l'utilisation de 2 molécules différentes. La 1^{ère} molécule testée fut le Périndopril. Les IEC ont une place privilégiée dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. En plus de leurs propriétés antioxydantes, ils luttent contre le remodelage ventriculaire et facilitent le travail cardiaque. Nous avons ensuite tenté d'évaluer la cardioprotection apportée par l'acide alpha-lipoïque qui possède un pouvoir antioxydant basé sur la chélation de certaines espèces radicalaires mais aussi la régénération de différents complexes antioxydants. La 2^{ème} partie de notre travail, plus clinique, a eu pour but d'étudier le sur-risque cardiovasculaire, à court terme, d'une population de patientes aux antécédents de cancer lors d'un infarctus du myocarde.

II.

APPROCHES EXPERIMENTALES

II.1.- Effects of Angiotensin-1 Converting Enzyme Inhibition on Oxidative Stress and Bradykinin Receptor Expression During Doxorubicin-induced Cardiomyopathy in Rats

Objectifs

Notre premier travail expérimental porte sur l'étude du stress oxydant dans la cardiomyopathie aux Anthracyclines et évalue l'impact d'un traitement par inhibiteur de l'enzyme de conversion sur la production d'espèces radicalaires et le développement de cette cardiomyopathie toxique. Dans cette étude, l'évaluation des différents paramètres a été précoce, 18 jours après le début du traitement par Doxorubicine et Périndopril.

Les objectifs de ce travail ont été multiples:

- développer un modèle expérimental de cardiomyopathie chronique aux Anthracyclines.
- apprécier, en échocardiographie, le développement de cette cardiomyopathie.
- évaluer précocement les niveaux de stress oxydant circulant et tissulaire mais aussi l'expression des récepteurs à la bradykinine après l'administration intra-péritonéale de Doxorubicine.
- étudier le rôle potentiellement cardioprotecteur d'un traitement par inhibiteur de l'enzyme de conversion dans la cardiomyopathie toxique aux Anthracyclines.

Résultats

L'injection intra-péritonéale de 1mg/kg/jour de Doxorubicine pendant 10 jours a conduit à l'apparition d'une dysfonction myocardique avec une dilatation échocardiographique du DTDVG sans altération de la FEVG ($p=0,01$). Au niveau plasmatique, nous avons observé une diminution significative du taux d'acide ascorbique chez les rats traités par Doxorubicine ($p<0,05$). Aucune différence significative n'a été mise en évidence, entre les différents groupes, en ce qui concerne les dosages plasmatiques de la troponine et du BNP. Il en est de même pour l'évaluation du stress oxydant tissulaire qui n'a pas retrouvé de différence significative entre les différents groupes aussi bien par l'étude des TBARs, du DHE que de la production d'anion superoxyde en RPE. L'étude immunohistochimique du tissu myocardique a retrouvé une augmentation de l'expression de MCP-1 signant un état inflammatoire plus important au niveau du cœur des rats traités par la Doxorubicine. La production d'ARN messager des récepteurs B1 et B2 à la bradykinine ainsi que leur expression ne semblent pas

avoir été influencées par l'injection de Doxorubicine. L'administration d'inhibiteur de l'enzyme de conversion n'a pas prévenu la dilatation du DTDVG secondaire à l'injection de Doxorubicine. Elle a limité la diminution du taux circulant d'acide ascorbique observé sous Doxorubicine sans toutefois diminuer la production d'espèces radicalaires au niveau tissulaire.

Effects of Angiotensin-1 Converting Enzyme Inhibition on Oxidative Stress and Bradykinin Receptor Expression During Doxorubicin-induced Cardiomyopathy in Rats

Carole Richard,* Benjamin Lauzier,* Stéphanie Delemasure,* Sébastien Talbot,§ Stéliciana Ghibu,† Bertrand Collin,* Jacques Sénécal,§ Franck Menetrier,‡ Catherine Vergely,* Réjean Couture,§ and Luc Rochette*

Abstract: To evaluate the mechanisms and the impact of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril (P) in a model of doxorubicin (D)-induced cardiotoxicity, male Wistar rats received D (1 mg/kg/d, IP for 10 days), P (2 mg/kg/d by gavage from day 1 to day 18), D (for 10 days) + P (for 18 days) or saline. D decreased systolic blood pressure and body and heart weights. Left ventricular diastolic diameter was increased by D ($P < 0.01$), but it was not attenuated by P. D decreased plasma vitamin C ($P < 0.05$) and increased the ascorbyl radical/vitamin C ratio ($P < 0.01$). This ratio was attenuated by P. No difference was found among groups in cardiac troponin I, brain natriuretic peptide concentrations, and tissue oxidative stress (OS). Myocardial MCP-1 expression was higher in the D group. Cardiac kinin receptor (B_1R and B_2R) expression was not affected by D, yet binding sites for B_2R and B_1R were increased in D+P and P groups, respectively ($P < 0.05$). In conclusion, D induced cardiac functional alterations, inflammation and plasma OS whereas tissue OS, and cardiac kinin receptors expression were not modified. P did not improve cardiac performance, but it modulated kinin receptor expression and enhanced antioxidant defense.

Key Words: anthracycline, angiotensin-1 converting enzyme inhibitor, cardiotoxicity, oxidative stress, inflammation, kallikrein-kinin system

(J Cardiovasc Pharmacol™ 2008;52:278–285)

Received for publication April 4, 2008; accepted July 10, 2008.

From the *Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, IFR n° 100, Facultés de Médecine et Pharmacie, 7 bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon cedex, France; †Département de Pharmacologie, Physiologie et Physiopathologie, Faculté de Pharmacie, Cluj-Napoca, Roumanie; ‡Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, IFR n° 100, Centre de Microscopie Appliqué à la Biologie et à la Médecine, 21000 Dijon, France; and §Département de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

This work was supported by the Conseil Régional de Bourgogne, the Faculty of Medicine and the Association de Cardiologie de Bourgogne (ACB).

The authors state that they have financial interest in the products mentioned within this article.

Reprints: Carole Richard, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, IFR n° 100, Facultés de Médecine et Pharmacie, 7 bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon cedex, France (e-mail: carolealinerichard@yahoo.fr).

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

INTRODUCTION

Anthracyclines are very effective broad-spectrum chemotherapeutic agents, but their use is restricted because of their acute, subacute, and chronic cardiotoxicity.¹ Cardiac injuries are asymptomatic for a long period and can appear months even years after the last injection of the drug. The main consequence is dilated cardiomyopathy, which induces congestive heart failure and can be life-threatening.² Some risk factors of cardiac injury due to anthracycline have been described. These include age, underlying heart disease, doses of chemotherapy agents, and previous irradiation. The mechanisms responsible for this cardiomyopathy are multifactorial, and it is now well known that oxidative stress plays an important role.^{3,4} The anthraquinone nucleus of anthracycline is reversibly converted to a free radical semiquinone in the presence of molecular oxygen leading to cellular damage.¹ Cardiac injury is also associated with apoptosis,^{5,6} immune reactions,⁷ genetic alterations,⁸ and the production of alcohol metabolites from anthracyclines.⁹ All of these factors induce modifications in calcium homeostasis and the inflammatory state. This inflammatory context associated with tissue injury is also responsible for B_1 and B_2 kinin receptors (B_1R and B_2R) modulation.¹⁰ Because alterations in the kallikrein-kinin system may contribute to the pathogenesis of heart failure,¹¹ one can wonder if changes in kinin receptor expression can also be involved in anthracycline cardiotoxicity. In animal studies, the use of antioxidants successfully limited this cardiotoxicity,^{12–16} whereas they failed to improve the prognosis in human trials. However, in clinical practice, it has been reported that dexrazoxane (an iron chelator) or anthracycline analogs are able to limit the above-mentioned harmful effects. Liposomal encapsulation and prolonged continuous infusion instead of bolus delivery have also been proposed, but neither was entirely satisfactory.^{17–19} Nowadays, heart failure induced by anthracycline is treated with conventional drugs such as β blockers, aldosterone receptor antagonists, and angiotensin-1 converting enzyme inhibitors (ACEIs), all of which have proven their efficacy in the treatment of heart failure.²⁰

A recent study has shown that ACEIs seem to effectively reduce anthracycline cardiotoxicity in adult patients who had received high doses of these chemotherapeutic agents.²¹ ACEIs could limit left ventricular dilation and reduced the ejection fraction. Thus, given that free radical species are the major agents of anthracycline cardiotoxicity, we decided to assess the evolution of oxidative stress generated by

doxorubicin injections in rats treated with an ACE inhibitor. The present study was undertaken to investigate the early pathophysiologic mechanisms of doxorubicin cardiotoxicity, evaluating oxidative stress status, inflammation and the level of bradykinin receptors expression. In this context, we have studied the impact of an ACEI (perindopril) on these mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of a Rat Model of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy

Forty-seven male Wistar rats (weight, 300 to 390 g at the beginning of the experiment) were used in this study. The local ethics committee approved the experimental protocol, and the investigators complied with authorization 6006 from the French Government, which complies with the Guide for the Care and use of Laboratory Animals published by US National Institutes for Health. Four groups were made up.

In the control group, the rats ($n = 11$) received saline: 1 mL/kg/d intraperitoneally (IP) from day 0 to day 10 and 2 mL/kg orally (PO) daily from day 0 to day 17.

In the doxorubicin-treated group (D), the rats ($n = 12$) were treated with doxorubicin (Pfizer, Paris, France) 1 mg/kg/d IP from day 0 to day 10 and saline PO as were controls. A total dose of 10 mg/kg was administered over the 10-day period.

In the perindopril group (P), the rats ($n = 12$) received perindopril (Servier, Paris, France) 2 mg/kg/d PO from day 0 to day 17 and saline IP as were controls.

The last group ($n = 12$) was treated with both doxorubicin and perindopril (D+P) at the same dose and over the same period as the 2 previous groups.

At day 18, the rats were anesthetized (sodium thiopental, 60 mg/kg IP) and euthanized. Just after abdominal incision, heparin (500 UI/kg) was injected into the inferior vein cava. Blood was taken and centrifuged (2000 \times g, 5 minutes) to obtain the plasma, which was immediately frozen. The heart was excised; the ventricles were cut into 4 segments, and both heart segments and aortas were frozen in liquid nitrogen at -80°C .

Heart Function Parameters

Body weight was monitored every day until the end of the study. Systolic blood pressure was measured every 3 days by the tail cuff method (LE 5007 Pressure Meter, Bioseb) throughout the protocol. On days 0 and 18, left ventricular performance was evaluated by echocardiography using an SSD 900 with a 7.5-MHz transducer (ALOKA; DMV Imaging, Cergy, France). Left ventricular end-systolic (LVSD) and diastolic (LVDd) diameters were measured, and fractional shortening (% FS) was calculated by the formula:

$$\% \text{FS} = \frac{\text{LVDd} - \text{LVSD}}{\text{LVDd}} \times 100$$

Plasma Evaluation

cTnI Plasma Concentrations

Cardiac troponin I (cTnI) concentrations were determined with an established immunoassay (High sensitivity rat

cardiac troponin-I Elisa kit, Lifediagnosics), which uses 2 different affinity purified antibodies. As previously described, the first was used for solid phase immobilization, and the second was conjugated with horseradish peroxidase (HRP). The plasma was allowed to react simultaneously with the 2 antibodies, resulting in the cTnI sandwiched between the solid phase and HRP-conjugated antibodies. After removing unbound HRP-conjugated antibodies, an HRP substrate, which induced a blue color, was added. The addition of HCl changed the color to yellow. Using a spectrometer, the concentration of cTnI was calculated and was proportional to the absorbance at 450 nm. The results are expressed in ng/ml.

Plasma Concentrations of BNP

Brain natriuretic peptide (BNP) concentrations were determined with an immunoassay (EIA for BNP-32, Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA). Briefly, peptide antibody was injected into specially treated wells. Rat plasma was added and incubated for 2 hours with peptide antibody. Biotinylated peptide, which competes with the plasma samples for the antibody binding sites, was added. After one night of incubation, unbound biotinylated peptide was removed and streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (SA-HRP) was added. An immobilized primary antibody/biotinylated peptide complex was then formed and excess SA-HRP was washed out. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride was added to react with the bound HRP, which induced a blue color. HCl was added to stop the reaction, and the color changed to yellow. Absorbance was then read at 450 nm, and the concentrations of BNP were calculated. The results are expressed in ng/ml.

Quantification of Ascorbyl Free Radical by Electron Spin Resonance spectroscopy

Thirty-five mL of plasma was put into a quartz capillary tube, which was then placed in an HS cavity for analysis at room temperature with a Bruker EMX band spectrometer. The following parameters were selected for optimal detection of ascorbyl radical: modulation frequency, 100 Hz; amplitude modulation, 0.8 G; microwave power, 40 Mw; microwave frequency, 8.5 GHz; conversion time, 40 ms; time constant, 327 ms; scan time, 41 s; gain, 5.105; number of scans, 6. The height of the signal intensity was measured and expressed in AU.

Superoxide Production in Tissue

Superoxide Production Evaluated by ESR Spin Probe

Intracellular superoxide formation was determined by the measurement of 3-methoxycarbonyl-proxyl nitroxide (CM[•]) produced by the oxidation of the cell-permeable spin probe 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH). Freshly isolated heart tissue was incubated in deferoxamine-chelated Krebs-HEPES solution containing CMH (200 mM; Noxygen, Elzach, Germany), deferoxamine (25 mM; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), and DETC (5 mM) for 20 min at 37°C.²² At the end of this incubation period, the tissue samples were immediately inserted into a polyethylene catheter and frozen in liquid nitrogen. Samples were analyzed in a liquid nitrogen ESR dewar. The acquisition

parameters of the Bruker EMX spectrometer 100 K were as follows: modulation frequency, 100 kHz; amplitude modulation, 2 G; microwave power, 20 Mw; microwave frequency, 9.84 GHz; conversion time, 82 ms; time constant, 65 ms; scan time, 84 s; gain, 5.104; number of scans, 1. The height of the CM[•] radical signal was measured, matched with heart sample weight, and expressed in AU/g.

Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARs)

The level of lipid peroxide in the hearts was measured by a colorimetric reaction with thiobarbituric acid. The hearts were homogenized in ice-cold phosphate buffered saline (0.05 M, pH 7). Then, 1.5 mL of a solution containing trichloroacetic acid, thiobarbituric acid, and hydrochloric acid was added. The color of the thiobarbituric acid pigment was developed in a water bath at 100°C for 15 minutes. After cooling with ice to room temperature, 1 mL of 70% trichloroacetic acid was added. After 90 minutes, the tubes were centrifuged and the colors of the TBARs layers were assessed at 553 nm. The absorbance values were compared with a standard curve. Total protein was determined according to the Bradford method.²³ The results are expressed in nmoles/g of proteins.

Superoxide Production by Fluorescence Histology

In the presence of superoxide, ethidine, a fluorescent compound, is formed from dihydroethidium (DHE), which thus makes it possible to measure superoxide production. Frozen heart tissues were fixed for 10 minutes in acetone. Slides were incubated in a dark humidified chamber at room temperature with DHE (5 mmol/L) for 5 minutes. The slides were immediately analyzed with a computer-based digitizing image system (Microvision, France) using a fluorescent microscope (Eclipse 600, Nikon, France) connected to a video camera (TriCCD, Sony, France). Fluorescence was detected at 590 nm; the results are expressed in fluorescence intensity/nuclear number.

Inflammatory State by Immunohistochemistry

Briefly, cryosections were fixed in acetone for 10 minutes. After washing in H₂O₂, monoclonal antibodies against MCP-1 (Santa Cruz, CA) were added to cryosections, which were left overnight at 4°C. The slices were washed 3 times in PBS-Tween and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (Dakocytomation, Denmark) for 1 hour. This was followed by 3 additional washes in PBS-Tween and then 3-amino-9-ethylcarbazole, a Substrat-Chromogen

(DakoCytomation) was added to the slices, which were counterstained with hemalum.

B₁ and B₂ Kinin Receptors mRNA by Real-Time Quantitative RT-PCR

Total cellular genomic RNA was extracted from homogenized hearts using the RNAeasy tissue mini kit, and a cDNA copy was synthesized using the QuantiTect Reverse Transcription kit, according to manufacturer's instructions (QIAGEN, Valencia, CA). Quantitative real-time PCR was performed using the QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN, Valencia, CA) and the M3 3000p real-time PCR system (Stratagene, La Jolla, CA). The sequence of primers for amplification of rat kinin receptors and the reference standard were designed by Vector NTI and used (Table 1). PCR conditions were: 95°C for 15 minutes, followed by 46 cycles at 94°C for 15 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. The cycle threshold (Ct) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above the background.²⁴ The relative quantification of gene expression was analyzed by the 2^{-D_{ct}} method.²⁵

Density and Distribution of Kinin Receptors by Autoradiography

Radioligands for kinin B₁ receptor (3-(4 hydroxyphenyl)propionyl-desArg⁹-D-Arg⁰[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]Bradykinin) and kinin B₂ receptor (3-(4 hydroxyphenyl)propionyl-DArg⁰[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]Bradykinin) were synthesized and kindly provided by Dr. Witold Neugebauer (Department of Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada). They were iodinated by the chloramine T method.^{26,27} The heart was mounted in a gelatin block and serially cut into 20-μm-thick coronal sections with a cryostat. The sections were thaw-mounted on 0.2% gelatin-0.033% chromium potassium sulfate-coated slides and kept at -80°C until use. On the day of experiments, sections were incubated at room temperature for 90 minutes in 25 mM PIPES-NH₄OH buffer (pH 7.4) containing: 1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM dithiothreitol, 0.014% bacitracin, 0.1 mM captopril, 0.2% bovine serum albumin (protease free), and 7.5 mM magnesium chloride in the presence of 200 pM of [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 (B₁ receptor radioligand) or 200 pM [¹²⁵I]-HPP-Hoe 140 (B₂ receptor radioligand).²⁸ Nonspecific binding was determined in the presence of 1 mM of unlabelled antagonist: R715 (AcLys[D-bNaI⁷, Ile⁸]des-Arg⁹-BK) (B₁ receptor antagonist),²⁹ or Hoe 140 (D-Arg[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) (B₂ receptor antagonist).³⁰ At the end of the incubation period, slides were transferred sequentially through 4 rinses of 4 minutes each in

TABLE 1. The Sequence of Primers for Amplification of Rat Kinin Receptors

	Sequences	Position	GenBank
B1 receptor forward	5# GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT 3#	367–391	NM_030851
B1 receptor reverse	5# CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT 3#	478–454	
B2 receptor forward	5# AGG TGC TGA GGA ACA ACG AGA TGA 3#	882–906	NM_173100
B2 receptor reverse	5# TCC AGG AAG GTG CTG ATC TGG AAA 3#	1014–990	
18s receptor forward	5# TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT 3#	363–386	X01117
18s receptor reverse	5# TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT 3#	470–447	

25 mM PIPES (pH 7.4, 4°C) dipped for 15 seconds in distilled water (4°C) to remove the excess of salts, and then air-dried. Kodak Scientific Imaging Films BIOMAX™ MR (Amersham Pharmacia Biotech Canada) were juxtaposed onto the slides in the presence of [¹²⁵I]-microscales and exposed at room temperature for 5 days (B₂ receptor) or 7 days (B₁ receptor). The films were developed (GBX developer) and fixed (GBX fixer). Autoradiograms were quantified by densitometry using an MCID™ image analysis system (Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canada). A standard curve from [¹²⁵I]-a-microscale was used to convert density levels into fmol/mg of protein.³¹ Specific binding was determined by subtracting values of nonspecific binding from that of total binding.

Statistical Analysis

All data are expressed as means ± SEM. To compare the groups at day 18, statistical analyses were performed with a 1-way analysis of variance (ANOVA) that was followed, if necessary, by a Newman-Keuls test and by a Student t test for kinin receptor expression. The evolution of parameters during the protocol was analyzed with a 2-way repeated measure ANOVA (SigmaStat). Significance was established at a value of P, 0.05.

RESULTS

Body Weight

Whereas controls and perindopril-treated rats gained weight throughout the protocol, doxorubicin induced a significant loss of body weight (P, 0.001). Treatment with perindopril was not able to counter this loss of body weight. At the interruption of doxorubicin, the weight of both doxorubicin-treated groups began to increase (Figure 1A).

Heart Weight, Ratio Heart Weight to Body Weight

The heart weight of rats treated with doxorubicin, perindopril, and the combination of the 2 decreased significantly compared to that of saline controls (controls, 0.816 ± 0.02 g; D, 0.746 ± 0.02 g; P, 0.726 ± 0.01 g; D+P, 0.696 ± 0.01 g; P, 0.001). The heart weight to body weight ratio (Figure 1B), which indicates the degree of cardiac hypertrophy, was significantly decreased by perindopril in comparison

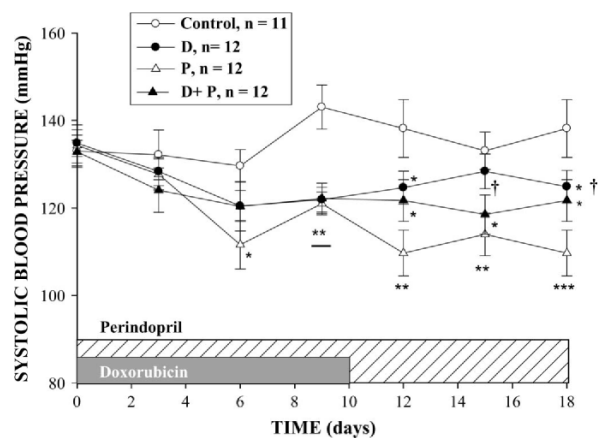


FIGURE 2. Systolic blood pressure (SBP) evolution in control group, doxorubicin (D) group (1 mg/kg/day, 10 days), perindopril (P) group (2 mg/kg/day, 17 days), and D+P group treated with doxorubicin and perindopril at the same dose during the protocol. *P, 0.05, **P, 0.01, and ***P, 0.001 versus Controls; †P, 0.05 versus P).

to both controls (P, 0.001) and the doxorubicin-treated group (P, 0.01).

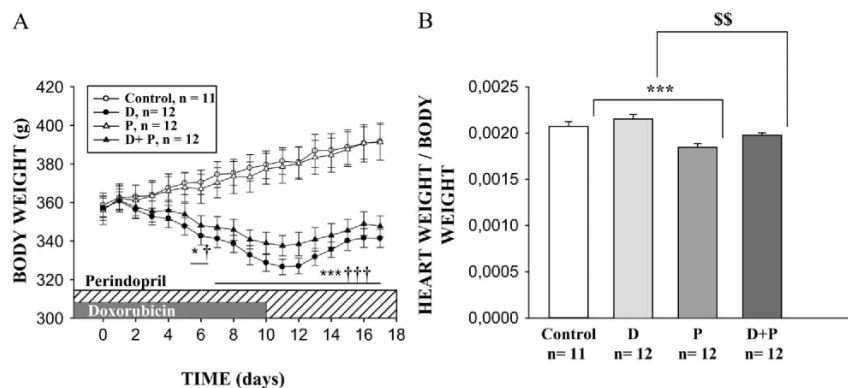
Systolic Blood Pressure

As shown in Figure 2, arterial systolic blood pressure of controls was relatively stable at approximately 135 mmHg throughout the protocol. In contrast, doxorubicin caused a significant decrease in systolic blood pressure on day 9 in comparison with controls (P, 0.01). At the end of doxorubicin treatment, systolic blood pressure stabilized at values close to 130 mmHg. As expected, the blood pressure of rats treated with perindopril fell to around 110 mmHg from the sixth day to the end of the protocol (P, 0.001 versus controls). There was no cumulative effect of doxorubicin and perindopril on arterial blood pressure level in the D + P group.

Echocardiographic Evaluation of Left Ventricular Function

In each group, no differences in echocardiographic parameters were observed between days 0 and 11. By day

FIGURE 1. Functional parameters in control group, doxorubicin (D) group (1 mg/kg/day, 10 days), perindopril (P) group (2 mg/kg/day, 17 days), and D+P group treated with doxorubicin and perindopril at the same dose during the protocol. (A) Body weight evolution (*P, 0.05 and ***P, 0.001 versus Control; †P, 0.05 and †††P, 0.001 versus P). (B) Heart weight to body weight ratio at day 18 (***P, 0.001 versus Control; \$\$\$P, 0.01 versus D+P).



18, the left ventricular end-diastolic diameter (LVDd) assessed by echocardiography in controls and in the rats that received perindopril was not modified, whereas a significant increase in LVDd was observed in animals treated with doxorubicin ($P < 0.01$; Figure 3). Treatment with perindopril did not prevent this dilation. Concerning end-systolic left ventricular diameter and left ventricular fractional shortening, no differences were observed between values obtained at day 0 and day 18 in each group (data not shown).

Plasma cTnI and BNP Concentrations

No differences were observed among the groups with regard to concentrations of plasma cTnI and BNP assessed using ELISA kits (Table 2).

Plasma Oxidative Stress

Control and perindopril groups presented comparable plasma concentrations of ascorbate (Table 1). Treatment with doxorubicin led to a significant reduction in the concentration of this antioxidant ($P < 0.05$ versus controls and P). However, the D+P group did not show a significant fall in ascorbate concentration. The level of plasma oxidative stress was estimated by the ascorbyl radical to ascorbate ratio (Table 1). Compared to controls and perindopril-treated rats, a significant increase in this ratio was observed in the doxorubicin-treated group ($P < 0.01$). Once again, treatment with perindopril attenuated the increase in the generation of plasma-free radicals induced by doxorubicin.

Oxidative Stress in Tissue

No differences among the groups were found for cardiac oxidative stress with the different techniques used (TBARS, superoxide production by ESR, DHE) (Table 1).

Inflammatory Status

In the D and D + P groups, MCP-1 immunoreactivity was detected in coronary endothelium, myocardial interstitium,

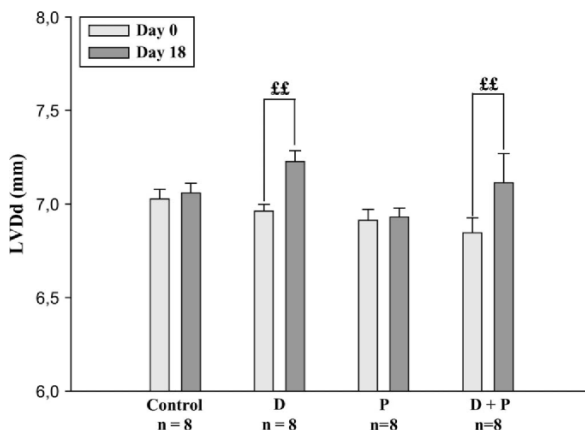


FIGURE 3. Left ventricular end-diastolic diameter (LVDd) in control group, doxorubicin (D) group (1 mg/kg/day, 10 days), perindopril (P) group (2 mg/kg/day, 17 days), and D + P group treated with doxorubicin and perindopril at the same dose at day 18 (££P, 0.01 at day 0 versus day 18).

and cardiomyocytes, yet it was only detected in coronary endothelium in the control and perindopril group (Figure 4).

B₁ and B₂ Kinin Receptors mRNA

Whereas cardiac B₂ receptor mRNA was not significantly different among control, D, and D + P groups, an upward trend of B₂ receptor mRNA was observed in rats treated with P compared with controls ($P = 0.074$). No differences in B₁ receptor mRNA was observed between the 4 groups (Figure 5A).

Density of B₁ and B₂ Kinin Receptors Binding Sites

An upward trend of B₂ receptor binding sites was observed in the D and P groups compared to controls. In the D + P group, this increase was significant when compared with controls ($P = 0.012$). Concerning the B₁ receptor, cardiac binding sites increased in the D, P, and D+P groups compared to controls, but this increase reached significance only in the P group ($P = 0.041$) (Figure 5A and 5B).

DISCUSSION

The study of functional parameters in the D group showed a significant decrease in heart function that was not prevented by the association of perindopril. Heart weight reduction due to doxorubicin was described by Okumura et al.³² and is probably due to apoptosis and slowed growth. No differences were observed between the control and D group concerning the heart to body weight ratio because both the heart weight and the body weight were decreased by doxorubicin to the same proportion, resulting in a stable ratio. This ratio, which reflects cardiac hypertrophy, was decreased in the P and D + P groups. This result supports the work of Ishimitsu et al.³³ and is explained by the use of perindopril, which induces a decrease in both angiotensin II, which has a hypertrophic effect on cardiovascular cells, and aldosterone, which induces fibrosis in cardiovascular tissues. A significant decrease was observed in systolic blood pressure in the D and D + P groups. As previously described,³⁴ doxorubicin is responsible for a drop in arterial blood pressure. This drop cannot be explained by renal damage, which induces hypertension in the long term³⁵; according to Rabelo et al.,³⁶ the sympathetic nervous system is not affected at this dose of doxorubicin. Thus, cardiac injury and deterioration in the general state of health may explain this fall. Regarding echocardiographic parameters, dilation of LVDd was observed in the D group. The increase in LVDd due to doxorubicin was reported by Bertinchant et al.³⁷ No significant changes were noted in the LVDs and in fractional shortening; the increase in LVDd may be the first step of cardiac remodeling. LVDd was also increased in the D + P group. Thus the addition of perindopril to doxorubicin did not prevent this dilation. Tokudome et al.³⁸ noted that cardiac remodeling was limited by Temocapril only after 12 weeks of treatment; the absence of evidence of the efficacy of perindopril may be due to the short duration of the treatment.

Evaluation of plasma concentrations of cTnI and BNP showed no significant differences between the groups, so no

TABLE 2. Plasma and Cardiac Tissue Parameters Evaluated At Day 18

	Control	D	P	D + P
Plasma parameters at day 18				
Troponin Ic (ng/ml)	0.82 ± 0.04 (n = 10)	0.95 ± 0.06 (n = 10)	0.89 ± 0.02 (n = 9)	0.93 ± 0.06 (n = 10)
BNP (ng/ml)	0.30 ± 0.06 (n = 11)	0.20 ± 0.05 (n = 10)	0.18 ± 0.06 (n = 8)	0.20 ± 0.05 (n = 11)
Ascorbate (mM)	42.8 ± 5.6 (n = 11)	23.0 ± 2.6 (n = 12)*†	42.2 ± 2.3 (n = 12)	30.2 ± 2.6 (n = 12)
Ascorbyl radical (AU)/ascorbate (mM)	0.10 ± 0.01 (n = 11)	0.17 ± 0.01 (n = 12){‡}	0.10 ± 0.01 (n = 12)	0.14 ± 0.01 (n = 12)
Tissue parameters at day 18				
TBARs (nmoles/gr)	0.69 ± 0.03 (n = 10)	0.78 ± 0.06 (n = 12)	0.69 ± 0.06 (n = 12)	0.88 ± 0.07 (n = 11)
Superoxide Production (CMH UA/g)	15.7 ± 2 (n = 11)	18.0 ± 1.4 (n = 12)	20.2 ± 1.9 (n = 12)	18.2 ± 2.3 (n = 12)
DHE (% fluorescence/nucleus)	5.0.10 ³ ± 1.1.10 ³ (n = 9)	3.9.10 ³ ± 4.9.10 ⁴ (n = 9)	6.8.10 ³ ± 5.6.10 ⁴ (n = 9)	4.5.10 ³ ± 1.9.10 ⁴ (n = 9)

D, doxorubicin group (1mg/kg/day, 10days); P, perindopril group (2 mg/kg/day, 17 days); D + P, group treated with doxorubicin and perindopril at the same dose.
*P, 0.05 and †P, 0.01 versus control; {P, 0.05 and ‡P, 0.01 versus P).

increase in plasmatic cTnI concentrations due to doxorubicin was found. This finding supports the work of Bertinchant,³⁷ who considered different hypotheses to explain this result: minor myocyte damage, structural alterations of troponin, or a decrease in troponin synthesis induced by anthracycline. Unlike the study of Kohyama et al,³⁹ which reported a significant increase in plasma concentration of BNP induced by anthracycline, we found no differences in plasma levels of BNP in our groups. However, Chen et al⁴⁰ reported that doxorubicin inhibits BNP gene expression in cultured neonatal rat myocytes, and one can wonder if intraperitoneal injections of doxorubicin also damage gene expression. Gene study may have helped us to interpret the plasma concentrations of cTnI and BNP.

Concerning oxidative stress, analysis of the plasma showed a decrease in the concentration of ascorbate, which indicated a decrease in the antioxidant defense by doxorubicin. This has also been observed in human studies⁴¹ and can be explained by the decrease in hepatic ascorbate production and the increase in radical oxidative species as confirmed by the increase in the ascorbyl radical to ascorbate ratio. No significant differences were observed between the D + P group and controls with regard to levels of ascorbate and the ascorbyl radical to ascorbate ratio. The addition of perindopril to

doxorubicin seems to have induced an increase in the plasma concentration of ascorbate and a decrease in the ascorbyl radical to ascorbate ratio. This supports the beneficial effects of perindopril in reducing anthracycline cardiotoxicity. Evaluation of oxidative stress in tissue by TBARs, superoxide production, and DHE did not show any significant differences between groups. This suggests that free radical production induced by anthracycline was compensated by the endogenous protective antioxidant defenses. These defenses may have already recovered 7 days after the last injection of doxorubicin. No differences among the groups were found on tissue oxidative stress using the CMH approach. Moreover, radical oxygen species are unstable, their lifespan is short, and the damage they induce is not specific. Concerning the evaluation of superoxide production using an ESR spin probe, few published studies have assessed levels of oxidative stress in tissues using CMH, and more work needs to be done to improve the use of this new cell-permeable spin probe. Relating to TBAR production, no differences were observed between groups. Siveski-Illiskovic et al³⁴ reported an increase in cardiac TBARs after a cumulative dose of doxorubicin of 15 mg/kg administered over a period of 2 weeks, but we must underscore the fact that many molecules with no oxidative power can react with TBA to produce TBARs, and this may

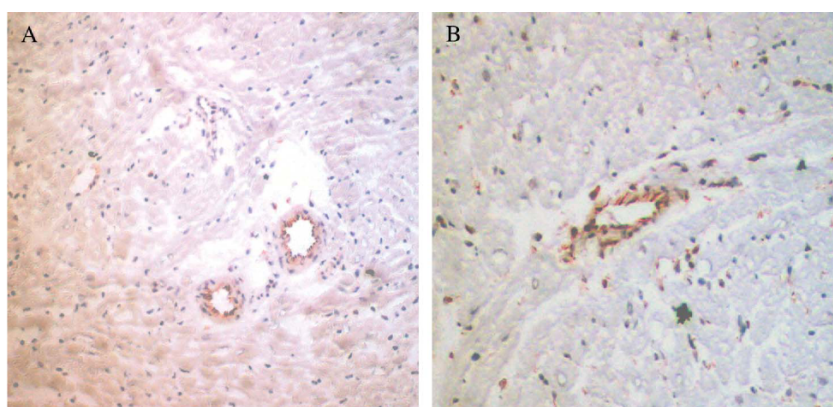


FIGURE 4. MCP-1 localization (red color) by immunohistochemistry in (A) control myocardium and (B) doxorubicin-treated group myocardium.

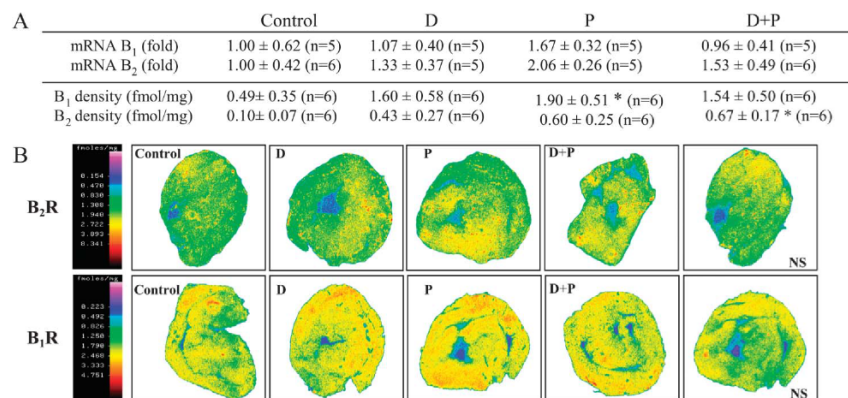


FIGURE 5. B₁ and B₂ kinin receptors in myocardium, analyzed by (A) RT-PCR and (B) autoradiography at day 18, in control group, doxorubicin (D) group (1 mg/kg/day, 10 days), perindopril (P) group (2 mg/kg/day, 17 days), and D + P group (*P, 0.05 versus Control).

have distorted our results. No differences in superoxide production between groups were noted when DHE was used in a histological approach. The quenching effect may explain the downward trend in ethidine production due to doxorubicin. The doxorubicin that accumulated in cardiac tissue may have affected emission wavelength and so decreased the fluorescence due to ethidine. Even though no increase in oxidative stress in tissue was noted, immunohistochemistry revealed a greater degree of cardiac inflammation in the D group, suggesting that anthracycline is cardiotoxic. This inflammatory myocardial state due to doxorubicin was not prevented by perindopril. This finding is in accordance with the work of Shibakura et al,⁴² who reported that doxorubicin induced MCP-1 production in small-cell lung carcinoma cells.

The inflammatory process associated with oxidative stress-induced tissue injury is known to induce dysfunction of the kallikrein-kinin system.⁴³ It was thus interesting to study the constitutive B₂ receptor and the inducible B₁ receptor in this model of anthracycline cardiotoxicity. Furthermore, it is important to underline the fact that the beneficial effect of ACEI in heart failure seems to involve regulation of kinin receptors.⁴⁴ In our study, B₁ receptor mRNA and binding sites were not significantly increased in the myocardium 7 days after the final injection of doxorubicin. Thus the induction of B₁ receptors by inflammatory cytokines and oxidative stress,^{10,43,45} which involves MAP-kinase and the nuclear transcription factor NF-κB⁴⁶ does not appear to occur in the model of cardiotoxicity induced by doxorubicin. However, B₁ receptor binding sites were increased under perindopril treatment. This is consistent with previous studies that have provided evidence for an upregulation of B₁ receptors under ACEI therapy.^{27,47,48} B₂ receptor mRNA followed the same trends as those for B₁ receptors. This receptor is also upregulated by interleukin-1 and tumor necrosis factor.⁴⁹ Thus, the inflammatory state of the heart and the production of cytokines induced by doxorubicin may partly explain this result. Similarly to the effect on B₁ receptors, perindopril induced an upward trend in B₂ receptor expression. This is in accordance with earlier work showing an increase in the number of cell-surface B₂ receptors induced by ACEI treatment.⁵⁰ In our study, this increase was significant in the D+P group and could be explained by a possible additive

effect of doxorubicin and perindopril treatments on B₂ receptor expression. Further pharmacological studies will be needed to determine whether kinin B₁ and B₂ receptors are cardioprotective or not in this model of cardiomyopathy.

To conclude, IP administration of doxorubicin to a total cumulative dose of 10 mg/kg over a period of 10 days induced cardiac dysfunction without heart failure in our rat model. Plasma oxidative stress increased, whereas oxidative stress in heart tissue remained stable. Myocardial inflammatory and oxidative stress levels in doxorubicin-treated rats were probably too low to increase B₁ and B₂ receptors expression significantly. During treatment with doxorubicin, the use of an ACEI did not prevent cardiac dilation but reduced plasma oxidative stress. One possible limitation of our study is the early evaluation of cardiac remodeling. Hence, complete understanding of anthracycline cardiotoxicity and of the potential beneficial effects of ACEIs will require studies with longer treatment periods.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge the continuing support of the University Hospital Center of DIJON, the Regional Council of Burgundy, the Cardiology Association of Burgundy, and the Medicine Faculty of Dijon. We thank Philip Bastable for correcting the English in the manuscript.

REFERENCES

- Delemasure S, Vergely C, Zeller M, et al. [Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclins. From basic concepts to clinical data]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2006;55:104-112.
- Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998;339:900-905.
- Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab*. 2000;71:436-444.
- Delemasure S, Sicard P, Lauzier B, et al. Acute administration of epirubicin induces myocardial depression in isolated rat heart and production of radical species evaluated by electron spin resonance spectroscopy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50:647-653.
- Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci*. 2006;101:151-158.
- Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, et al. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms.

- intermediacy of H_2O_2 - and p53-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2004; 279:25535–25543.
7. Huber SA. Doxorubicin-induced alterations in cultured myocardial cells stimulate cytolytic T lymphocyte responses. *Am J Pathol*. 1990;137:449–456.
 8. Ito H, Miller SC, Billingham ME, et al. Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:4275–4279.
 9. Minotti G, Recalcati S, Mordente A, et al. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *Faseb J*. 1998;12:541–552.
 10. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, et al. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2001;429:161–176.
 11. Cheng CP, Onishi K, Ohta N, et al. Functional effects of endogenous bradykinin in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1679–1686.
 12. Bast A, Haenen GR, Bruynzeel AM, et al. Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol*. 2007;7:154–159.
 13. Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, et al. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol*. 2005;5:257–267.
 14. Bjelogric SK, Radic J, Jovic V, et al. Activity of d, l-alpha-tocopherol (vitamin E) against cardiotoxicity induced by doxorubicin and doxorubicin with cyclophosphamide in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005;97:311–319.
 15. Danesi F, Malaguti M, Nunzio MD, et al. Counteraction of adriamycin-induced oxidative damage in rat heart by selenium dietary supplementation. *J Agric Food Chem*. 2006;54:1203–1208.
 16. El-Demerdash E, Ali AA, Sayed-Ahmed MM, et al. New aspects in probucol cardioprotection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;52:411–416.
 17. Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, et al. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol*. 2005;131:561–578.
 18. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, et al. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol*. 2007;117:6–15.
 19. Singal PK, Li T, Kumar D, et al. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem*. 2000;207:77–86.
 20. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med*. 1987;316:1429–1435.
 21. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, et al. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*. 2006;114:2474–2481.
 22. Dudley SC, Jr., Hoch NE, McCann LA, et al. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation*. 2005;112:1266–1273.
 23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–254.
 24. Wada R, Tiffit CJ, Proia RL. Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10954–10959.
 25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*. 2001;25:402–408.
 26. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*. 1962;194:495–496.
 27. Ongali B, Buck Hde S, Cloutier F, et al. Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H1949–1958.
 28. Cloutier F, de Sousa Buck H, Ongali B, et al. Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B(2) receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2002;135:1641–1654.
 29. Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, et al. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol*. 1998;348:1–10.
 30. Hock FJ, Wirth K, Albus U, et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol*. 1991;102:769–773.
 31. Nazarali AJ, Gutkind JS, Saavedra JM. Calibration of 125I-polymer standards with 125I-brain paste standards for use in quantitative receptor autoradiography. *J Neurosci Methods*. 1989;30:247–253.
 32. Okumura K, Jin D, Takai S, et al. Beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in adriamycin-induced cardiomyopathy in hamsters. *Jpn J Pharmacol*. 2002;88:183–188.
 33. Ishimitsu T, Honda T, Ohta S, et al. Cardiorenal protective effects of year-long antihypertensive therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor or a calcium channel blocker in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2006;19:1233–1240.
 34. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probucool promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation*. 1994;89:2829–2835.
 35. Bertani T, Rocchi G, Sacchi G, et al. Adriamycin-induced glomerulosclerosis in the rat. *Am J Kidney Dis*. 1986;7:12–19.
 36. Rabelo E, De Angelis K, Bock P, et al. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycin-induced heart failure. *Hypertension*. 2001;38:576–580.
 37. Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, et al. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clin Chim Acta*. 2003;329:39–51.
 38. Tokudome T, Mizushige K, Noma T, et al. Prevention of doxorubicin (adriamycin)-induced cardiomyopathy by simultaneous administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor assessed by acoustic densitometry. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36:361–368.
 39. Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, et al. Brain from bone: efficient “metadifferentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation*. 2001;68:235–244.
 40. Chen S, Garami M, Gardner DG. Doxorubicin selectively inhibits brain versus atrial natriuretic peptide gene expression in cultured neonatal rat myocytes. *Hypertension*. 1999;34:1223–1231.
 41. Erhola M, Kellokumpu-Lehtinen P, Metsa-Ketela T, et al. Effects of anthracycline-based chemotherapy on total plasma antioxidant capacity in small cell lung cancer patients. *Free Radic Biol Med*. 1996;21:383–390.
 42. Shibakura M, Niiya K, Kiguchi T, et al. Induction of IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 by doxorubicin in human small cell lung carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2003;103:380–386.
 43. Couture R, Girolami JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*. 2004;500:467–485.
 44. Witherow FN, Helmy A, Webb DJ, et al. Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. *Circulation*. 2001;104:2177–2181.
 45. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev*. 1998;50:357–386.
 46. Campos MM, Souza GE, Calixto JB. In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br J Pharmacol*. 1999;127:1851–1859.
 47. Marin-Castano ME, Schanstra JP, Neau E, et al. Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation*. 2002;105:627–632.
 48. Duguay D, Der Sarkissian S, Kouz R, et al. Kinin B2 receptor is not involved in enalapril-induced apoptosis and regression of hypertrophy in spontaneously hypertensive rat aorta: possible role of B1 receptor. *Br J Pharmacol*. 2004;141:728–736.
 49. Yayama K, Nagaoka M, Takano M, et al. Expression of kininogen, kallikrein and kinin receptor genes by rat cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1495:69–77.
 50. Sato T, Inagaki A, Uchida K, et al. Diabetes mellitus after transplant: relationship to pretransplant glucose metabolism and tacrolimus or cyclosporine A-based therapy. *Transplantation*. 2003;76:1320–1326.

II.2.- General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid.

Objectifs

Notre deuxième travail expérimental s'appuie sur les résultats du premier. L'évaluation de la fonction cardiaque et du stress oxydant, 18 jours après le début du traitement par Doxorubicine, retrouvait un début de dysfonction myocardique sans diminution de la FEVG et une diminution du taux plasmatique d'acide ascorbique sans majoration du stress oxydant tissulaire. Cette deuxième étude repose sur la persistance du processus oxydatif bien après l'arrêt des Anthracyclines et porte sur l'évaluation de la fonction cardiaque et du stress oxydant 1 mois et 2 mois après l'arrêt du traitement par Doxorubicine. Par ailleurs, ce travail évalue le rôle de l'acide alpha-lipoïque dans la prévention de la cardiotoxicité des Anthracyclines. Les objectifs de cette étude ont donc été multiples:

- développer un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque chronique secondaire à l'administration de Doxorubicine.
- étudier les paramètres hémodynamiques à distance d'un traitement par Anthracyclines grâce au cathétérisme cardiaque.
- apprécier le stress oxydant plasmatique et tissulaire 1 mois et 2 mois après l'arrêt de ce traitement.
- évaluer l'impact de l'administration d'acide alpha-lipoïque sur l'atteinte cardiaque et sur la production d'espèces radicalaires liées au traitement par Doxorubicine.

Résultats

Le sacrifice des rats, 1 mois et 2 mois après le traitement par Doxorubicine, a montré l'existence d'une ascite importante chez ces animaux. Lors de l'évaluation à 2 mois, le cathétérisme cardiaque de ces animaux retrouvait une diminution significative de la contractilité myocardique ($p=0,034$) n'existant pas lors de l'évaluation à 1 mois. Deux mois après l'administration de Doxorubicine, une diminution significative du taux plasmatique d'acide ascorbique était observée ($p<0,01$), il existait, par ailleurs, une augmentation non significative du taux de TBARs, reflet de la peroxydation lipidique. En ce qui concerne la production d'hydroperoxydes évaluée par le test « FORT », l'augmentation initiale retrouvée à 1 mois ne persistait pas à 2 mois. Le niveau de stress oxydant tissulaire, évalué à 2 mois par

la formation de TBARs et la production d'anions superoxyde, apparaissait supérieur chez les rats traités par Anthracyclines (respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,05$). L'administration préalable puis concomitante d'acide alpha-lipoïque à la Doxorubicine n'a pas prévenu l'altération de la fonction cardiaque ni la majoration du stress oxydant observées sous l'action des Anthracyclines. L'association d'acide alpha-lipoïque à la Doxorubicine apparaît même, contrairement aux résultats escomptés, plutôt délétère.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Research paper

General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid

Steliana Ghibu ^a, Stéphanie Delemasure ^b, Carole Richard ^b, Jean-Claude Guillard ^b, Laurent Martin ^c,
Ségolène Gambert ^d, Luc Rochette ^b, Catherine Vergely ^{b,*}

^a Department of Pharmacology, Physiology and Physiopathology, Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Uuj-Napoca, Romania

^b Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, Université de Bourgogne, IFR Santé-STIC 100, Facultés de Médecine et Pharmacie, 7 bd. Jannet d'Arc, 21000 Dijon, France

^c Department of Pathology, Pôle Technique de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 2 rue Angélique Ducoudray, 21000 Dijon, France

^d Department of Biochemistry, Pôle Technique de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 2 rue Angélique Ducoudray, 21000 Dijon, France

article info

Article history:

Received 27 October 2010

Accepted 25 February 2011

Available online xxx

Keywords:

Doxorubicin
Alpha-lipoic acid
Rat hearts
Oxidative stress
Cardioprotection
Anthracyclines

abstract

To evaluate the effects of alpha-lipoic acid (AL) in a model of doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity, male Wistar rats were treated with DOX (1 mg/kg/d; 10 d) in combination or not with AL (50 mg/kg/d; 15 d). Plasma oxidative stress was determined by hydroperoxides (ROOH) and the ascorbyl radical/ascorbate ratio. One and two months later, the functional parameters of the hearts were determined in vivo by catheterization and cardiac oxidative stress was assessed by malondialdehyde (MDA) and O₂^{•-} (dihydroethidium fluorescence) content in tissue.

After two months, body weight was higher in the DOXe AL group than in DOX (p 16%, but this was due to ascites. Histological liver alterations were observed in both the DOX and DOXe AL groups. Plasma ROOH concentrations decreased after 10 days of AL treatment, but were greater in both the DOX and DOXe AL groups. After two months, a decrease in the cardiac contractility index (Δ27% and Δ29% respectively) and cardiac hypertrophy were observed in DOX and DOXe AL. These dysfunctions were associated with 1) a reduction in plasma ascorbate levels and an increase in the ascorbyl/ascorbate ratio and 2) an increase MDA and O₂^{•-} content in cardiac tissue.

In conclusion, a cumulative dose of 10 mg/kg doxorubicin induced functional alterations in the heart associated with plasma and cardiac oxidative stress. The co-administration of the antioxidant compound AL had no beneficial effects in this situation.

© 2011 Published by Elsevier Masson SAS.

1. Introduction

Doxorubicin is an anthracycline anti-neoplastic drug used in the treatment of a wide range of solid tumors and of leukemia in children and adults. Despite its good therapeutic results, the clinical use of doxorubicin during chemotherapy is limited since it induces acute or sub-acute, early chronic or late chronic cardiotoxicity [1,2]. Cardiac alterations become more obvious several years after the end of the treatment and may occur as dilated cardiomyopathy leading to congestive heart failure [3e 6].

Abbreviations: AFR, ascorbyl free radical; AL, alpha-lipoic acid; ANOVA, analysis of variance; AU, arbitrary units; DHE, dihydroethidium; DHLA, dihydrothiolipoic acid; DOX, Doxorubicin; ESR, electron spin resonance; HR, heart rate; Ht, hematocrit; LVDP, left ventricular developed pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVESP, left ventricular end-systolic pressure; O₂^{•-}, superoxide anion; ROOH, hydroperoxides; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

* Corresponding author. Tel.: þ 33 3 80 39 34 60; fax: þ 33 3 80 39 32 93.

E-mail address: cvergely@bourgogne.fr (C. Vergely).

0300-9084/\$ e see front matter © 2011 Published by Elsevier Masson SAS.

doi:10.1016/j.biochi.2011.02.015

Despite a large amount of research on this subject, the molecular mechanisms involved in chronic anthracycline cardiotoxicity remain a major topic of discussion. Several aspects of this phenomenon, such as apoptosis or the alteration of iron and calcium homeostasis have been described but the exact mechanism is not yet fully understood. Indeed, oxidative stress is believed to be an important pathway involved in the cardiac side-effects of anthracycline therapy [7e 9]. It is widely known that superoxide anion free radical O₂^{•-} is generated during the "redox cycling" of anthracycline or after oxido-reduction processes taking place inside the anthracycline iron complex. Then, O₂^{•-} is converted to hydroxyl radical (HO[•]) in the presence of transition metals or forms peroxynitrite (ONOO[•]) in the presence of nitric oxide (NO). Both of these are strong oxidants which can induce cellular injury [9e 11].

Along with preventive measures implemented to limit anthracycline-induced cardiotoxicity [4,12], several antioxidant molecules have been tested for their potential cardioprotective effects in different experimental models in the last forty years. Despite some

Please cite this article in press as: S. Ghibu, et al., General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid, Biochimie (2011), doi:10.1016/j.biochi.2011.02.015

56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110

2

S. Ghibu et al. / Biochimie xxx (2011) 1e8

111 beneficial results of vitamin E, vitamin A, N-acetyl cysteine, pro-
 112 bucol [13], carvedilol, glutathione, superoxide dismutase, catalase,
 113 none of these antioxidants has proved to be clearly beneficial
 114 in humans [14,15]. The only drug presently approved for use in
 115 clinical practice to reduce the cardiac side-effects of anthracyclines
 116 is dexrazoxane (Cardioxane[®]) [15e17], a prodrug of ADR-925,
 117 a compound with a chemical structure close to that of ethylenedi-
 118 amine tetra-acetic acid, which chelates intracellular iron [15,18,19].

119 In this context, it seems interesting to evaluate the possible
 120 cardioprotective effects of alpha-lipoic acid (AL). Alpha-lipoic acid
 121 or thioctic acid (6,8-dithio-octanoic) is a thiol compound with
 122 antioxidant properties which can be found in plants and animals.
 123 AL is able to scavenge free radicals (HO[•], HCO[•], ¹O₂), chelate tran-
 124 sition metals (iron and copper) or regenerate oxidized forms of
 125 antioxidants (vitamin E, vitamin C and glutathione) [20,21]. AL is
 126 both water- and lipid-soluble, a property which allows it to
 127 concentrate in cellular and extracellular environments. Exogenous
 128 AL is rapidly absorbed from the diet, and is reduced inside the cell
 129 to dihydrolipoic acid (DHLA), the most active form of the substance
 130 [22,23]. Its low negative redox potential (0.32 V) gives AL/DHLA
 131 strong reducing properties. A number of studies have reported the
 132 beneficial effects of AL in diabetes mellitus, insulin resistance [24],
 133 diabetic neuropathy [25,26], vascular inflammation [27,28], eryth-
 134 rocyte membrane stability [29] and neurodegenerative diseases
 135 [23,30]. All these effects are associated with its antioxidant prop-
 136 erties. However, a few recent studies have reported that the pro-
 137 oxidant potential of AL and DHLA depends on the type of oxidative
 138 stress and the physiological conditions [31,32].

139 In this general context, the aims of our work were: 1) to create
 140 a model of chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats, 2)
 141 to confirm the physiopathological role of oxidative stress in cardiac
 142 injury and 3) to assess the impact of treatment with alpha-lipoic
 143 acid (AL) in these experimental conditions.

144 2. Materials and methods

145 2.1. Animals and experimental protocol

146 The local ethics committee approved the experimental protocol
 147 and the investigators complied with authorization 6007 from the

176 French government, which agrees with ECDirective 86/609: EEC for
 177 animal experiments. For the purpose of our study, 72 male Wistar
 178 rats (Charles-River, L'Arbresle, France; 300e350 g at the beginning
 179 of the experiment) were divided into 4 groups.

180 In the control group (C, n ¼ 18), the rats received saline solution:
 181 1 ml/kg/day intraperitoneally (i.p.) for 15 days; from day Å5 (D Å 5)
 182 to day 9 (D9, Fig. 1).

183 In the doxorubicin-treated group (DOX, n ¼ 18), rats were
 184 injected i.p. with 1 mg/kg/day doxorubicin (Adriamycin[®], Pfizer,
 185 Paris, France) for 10 days, from day 0 (D0) to D9. A total dose of
 186 10 mg/kg doxorubicin was administered over the 10-day period
 187 (Fig. 1).

188 In the lipoic acid-treated group (AL), the rats were injected i.p.
 189 with 50 mg/kg/day alpha-lipoic acid (Thiogamma 600[®], Wörwarg
 190 Pharma, Germany) for 15 days, from D Å 5 to D9. A total dose of
 191 750 mg/kg lipoic acid was administered over the 15-day period
 192 (Fig. 1).

193 In the last group (DOXeAL, n ¼ 18), the rats were treated with
 194 both doxorubicin and alpha-lipoic acid at the same dose as the two
 195 previous groups. During the first 5 days, the rats were injected with
 196 alpha-lipoic acid (50 mg/kg/day), then given a combined therapy:
 197 doxorubicin (1 mg/kg/day) and alpha-lipoic acid for 10 days (Fig. 1).

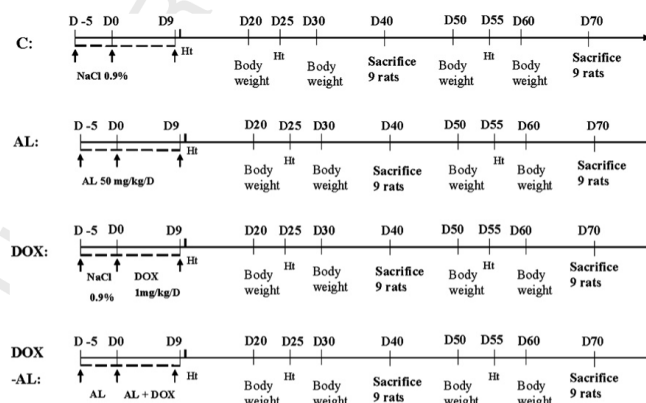
198 The rats were killed one month (D40; Series I, n ¼ 36) or two
 199 months (D70; Series II, n ¼ 32) after the end of the treatment. Each
 200 series was composed of 4 groups of animals (C: n ¼ 9; DOX: n ¼ 9;
 201 AL: n ¼ 9; DOXeAL: n ¼ 9) (Fig. 1).

202 The body weight of the rats was monitored daily during the
 203 period of treatment (D Å 5 to D9), then every 10 days. Moreover,
 204 food and water consumption was measured. The concentrations of
 205 hematocrit (Ht) and plasma hydroperoxide were evaluated
 206 throughout the study period.

207 At the end of the study (D40; D70) the volume of abdominal
 208 ascites was measured and the functional parameters of the hearts
 209 were evaluated *in vivo* by left ventricular catheterization. Liver
 210 tissue samples were harvested for further histological analysis.

211 2.2. Heart functional parameters measured *in vivo*

212 The rats were anaesthetized with sodium thiopental (60 mg/
 213 kg, i.p.) and heparinized (500 IU/kg). After thorax depilation,



214 Fig. 1. Experimental protocol. In the control group (C, n ¼ 18), rats received saline solution: 1 ml/kg/day intraperitoneally (i.p.) for 15 days; from day Å5 (D Å 5) to day 9. In the
 215 doxorubicin-treated group (DOX, n ¼ 18), rats were injected i.p. with 1 mg/kg/day doxorubicin for 10 days, from day D0 to D9. In the lipoic acid-treated group (AL), rats were injected
 216 i.p. with 50 mg/kg/day alpha-lipoic acid for 15 days, from D Å 5 to D9. In the last group (DOXeAL, n ¼ 18), rats were treated with both doxorubicin and alpha-lipoic acid at the same
 217 dose as the two previous groups. The rats were killed one month (D40) or two months (D70) after the end of the treatment with doxorubicin or saline, and hematocrit (Ht) was
 218 periodically measured.

Please cite this article in press as: S. Ghibu, et al., General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid, Biochimie (2011), doi:10.1016/j.biochi.2011.02.015

241 a catheter connected to a pressure transducer, was inserted into
242 the left ventricle through the chest wall in order to measure heart
243 rate (HR) and left ventricular pressures (left ventricular end-
244 diastolic pressure: LVEDP, left ventricular systolic pressure: LVSP,
245 left ventricular developed pressure: LVDP $\frac{1}{4}$ LVSP $\dot{\Delta}$ LVEDP)
246 during the first minute of cardiac catheterization. Left ventricle
247 contractility was expressed as β dP/dt and left ventricle relaxation
248 as $\dot{\Delta}$ dP/dt.

249 At the end of the study the blood was taken by cardiac
250 puncture, centrifuged and the plasma was immediately frozen in
251 liquid nitrogen. The hearts were excised, cut into segments and
252 frozen.

253 2.3. Blood/plasma measurements

254 2.3.1. Hematocrit (Ht)

255 The hematocrit (Ht, or erythrocyte volume fraction) of the rats'
256 blood was measured before the injection of doxorubicin or alpha-
257 lipoic acid (D $\dot{\Delta}$ 5), at the end of the treatment (D10) and every 15
258 days during period of observation. For this purpose, a small quan-
259 tity of blood was collected from the tail in a heparinized capillary
260 tube and centrifuged to determine the proportion of blood volume
261 made up by red blood cells.

262 2.3.2. Plasma lipid peroxidation

263 2.3.2.1. Determination of plasma hydroperoxides using the "FORT"
264 test. The "FORT" test is a colorimetric test based on the ability of
265 transition metals such as iron, to catalyze in the presence of
266 hydroperoxides (ROOH), the formation of free radicals (ex: RO,
267 ROO) which are then trapped by a chemical amine derivative
268 (O $\dot{\Delta}$ NH $\dot{\Delta}$). This amine reacts with free radicals to form a stable
269 colored cation radical $\dot{\Delta}$ O $\dot{\Delta}$ NH $\dot{\Delta}$ $\dot{\Delta}$ the absorbance of which is
270 measured at 505 nm. The intensity of the color correlates directly
271 with the amount of free radical compound (Beer Lambert Law) and,
272 consequently, the oxidative level of the sample analyzed [33].

273 Hydroperoxides were measured in the plasma at D $\dot{\Delta}$ 5, D0, D10,
274 D40 and D70.

275 2.3.2.2. Determination of thiobarbituric acid reactive substances

276 (TBARS). Plasma lipid peroxides were measured by a colorimetric
277 reaction with thiobarbituric acid. One point five milliliter of tri-
278 chloroacetic acid/thiobarbituric acid/hydrochloric acid solution was
279 added to 500 μ L of plasma. The color of the thiobarbituric acid
280 pigment was developed in a water bath at 100 $\dot{\Delta}$ C for 15 min. After
281 cooling with ice to room temperature, 1 ml of 70%trichloroacetic
282 acid was added. After 1 h 30, the tubes were centrifuged and the
283 color of the TBARS layers was measured at 553 nm. The absorbance
284 values were compared with a standard curve. Results are expressed
285 in nmol/g proteins; plasma protein was determined according to
286 the method of Bradford [29].

287 Plasma TBARS were assessed only at the end of the study (D40;
288 D70).

289 2.3.3. Plasma ascorbyl free radical (AFR) assessment by electron 290 spin resonance (ESR) spectroscopy

291 35 μ L of plasma samples were inserted into a quartz capillary
292 tube which was placed in a HS cavity in order to analyze them at
293 room temperature with a Bruker EMX-100 X-band spectrometer
294 (Wissembourg, France). The following parameters were selected for
295 optimal detection of AFR [34]: modulation frequency: 100 kHz,
296 amplitude modulation: 0.8 G, microwave power: 40 mW, micro-
297 wave frequency: 8.5 GHz, conversion time: 40 ms, time constant:
298 327 ms, scan time: 41 s, gain: 5 $\dot{\Delta}$ 10 $\dot{\Delta}$, number of scans: 6. The
299 height of AFR signal intensity was measured and expressed in
300 arbitrary units (AU).
301
302
303
304
305

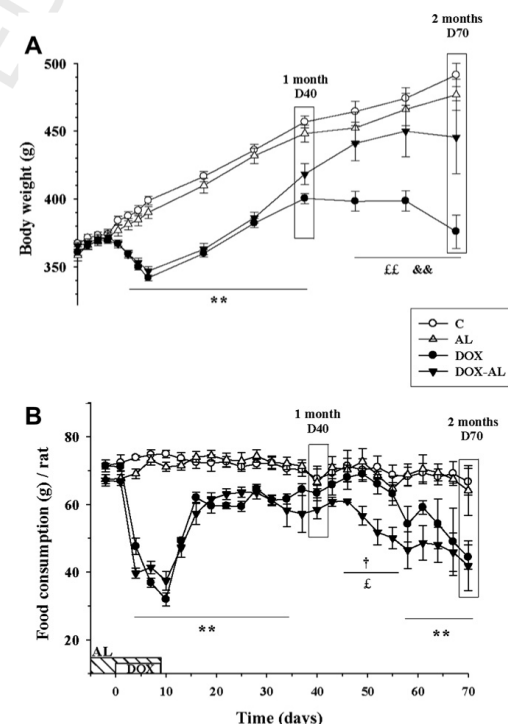
241 2.4. Measurements in tissues

242 2.4.1. Measurement of cardiac thiobarbituric acid reactive 243 substances (TBARS)

244 Heart lipid peroxides were measured by a colorimetric reaction
245 with thiobarbituric acid. Hearts were homogenized in ice-cold
246 phosphate buffered saline (0.05 M, pH 7). Then, 1.5 ml of tri-
247 chloroacetic acid/thiobarbituric acid/hydrochloric acid solution was
248 added. The color of thiobarbituric acid pigment was developed in
249 a water bath at 100 $\dot{\Delta}$ C for 15 min. After cooling to room tempera-
250 ture with ice, 1 ml of 70%trichloroacetic acid was added. After 1 h
251 30, tubes were centrifuged and the color of the TBARS layers was
252 measured at 553 nm. The absorbance values were compared with
253 a standard curve. Results are expressed in nmol/g of cardiac tissue.

254 2.4.2. Superoxide production by fluorescence histology

255 In the presence of superoxide, ethidine, a fluorescent
256 compound, is formed from dihydroethidium (DHE) making it
257 possible to quantify superoxide production. Frozen heart tissues
258 were fixed for 10 min in acetone. Sides were incubated in a light-
259 protected humidified chamber at room temperature with DHE
260 (5 μ M) for 5 min. The slides were immediately analyzed with
261 a computer-based digitizing image system (Microvision, France)
262 using a fluorescent microscope (Eclipse 600, Nikon, France)



306 Fig. 2. Evolution of body weight [A] and food consumption [B] in the control group (C),
307 alpha-lipoic acid group (AL), doxorubicin group (DOX) and doxorubicin plus alpha-lipoic
308 acid group (DOXeAL) throughout the period of study (** P < 0.01; DOX and DOXeAL vs.
309 C and AL; $\dot{\Delta}$ P < 0.01; DOX vs. C and AL; $\dot{\Delta}$ P < 0.05; DOXeAL vs. C and AL; $\dot{\Delta}$ P < 0.05
310 $\dot{\Delta}$ P < 0.01; DOXeAL vs. DOX).

Please cite this article in press as: S. Ghibu, et al., General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardio-
protection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid, Biochimie (2011), doi:10.1016/j.biochi.2011.02.015

371 Table 1
372 Abdominal ascitic fluid determined 1 month (D40) and 2 months (D70) after the end
373 of the treatment in the control group (C), alpha-lipoic acid group (AL), doxorubicin
374 group (DOX) and doxorubicin β alpha-lipoic acid group (DOXeAL) (**P < 0.01,
375 ***P < 0.001: DOX and DOXeAL vs. C and AL).

	Number of rats that developed abdominal ascites in each group and volume of ascites (ml)	
	1 month	2 months
C	0/9 0.32 \pm 0.08	0/9 0.23 \pm 0.02
AL	0/9 0.31 \pm 0.04	0/9 0.30 \pm 0.03
DOX	8/9 6.52 \pm 2.67***	9/9 1.01 \pm 0.23**
DOXeAL	7/7 19.16 \pm 3.87***	9/9 57.47 \pm 24.6***

376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435

connected to a video camera (TriCCD, Sony, France). Fluorescence was detected at 590 nm and carried forward to the nuclear number. Results are expressed in fluorescence intensity/nuclear number.

2.5. Statistical analysis

All data are expressed as means \pm SEM. To compare the groups, at 1 month and at 2 months after the end of the treatment, statistical analyses were performed with the one-factor analysis of variance (ANOVA) test (SigmaStat); ANOVA was followed, if necessary, by a Newman Keuls test. To compare the evolution of parameters throughout the period of the study (period of treatment and period of observation) we used a two-factor repeated measures analysis of variance (ANOVA) test (SigmaStat). Significance was established at a value of P < 0.05.

3. Results

Two rats of the DOXeAL group died during the observational period (at day 26 and day 30 after the end of the treatment). A very large volume of abdominal ascitic fluid was observed in these dead rats.

3.1. Body weight and food consumption in rats

Both controls and lipoic acid-treated rats gained weight during the period of study (period of treatment and period of observation). Doxorubicin induced a significant loss of body weight starting from the 3rd day of treatment. Lipoic acid associated with doxorubicin treatment was not able to counter this body weight loss. After interruption of the treatment, there was a trend toward recovery of body weight in rats from the DOX and DOXeAL groups with kinetics identical to those of rats from the Control and AL groups (Fig. 2A).

In our study, as might be expected, we found that body weight and food consumption followed approximately the same trend (Fig. 2B). Regarding the quantity of water drunk, no significant

436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500

436 differences were observed among the four groups of rats except during the 1st and 4th day after the end of the treatment when those treated with doxorubicin drank a smaller quantity of water than did the control rats (data not shown).

Two months after the end of the treatment (D70) body weight recovery was greater in DOXeAL rats than in DOX rats, but without an increase in food consumption (Fig. 2A and B). However, it appeared later that body weight gain in the DOXeAL group was due to the presence of a larger volume of abdominal ascitic fluid (Table 1).

3.2. Abdominal ascitic fluid and liver histological analysis

We noted that the accumulated volume of ascitic fluid at 1 month (D40) and 2 months (D70) after the end of the treatment was significantly higher in rats treated with doxorubicin alone or combined with alpha-lipoic acid (DOXeAL). It was also observed that the quantity of abdominal ascitic fluid was greater in the DOXeAL group than in the DOX group (Table 1). Histological analysis showed the presence of condensation and sinusoidal dilation in liver tissues of rats treated with doxorubicin alone or in combination with lipoic acid (Table 2) but the transaminase plasma levels (ASAT and ALAT) were not changed (data not shown).

3.3. Heart weight, heart weight to body weight ratio

Two months (D70) after the end of the treatment, doxorubicin alone or associated with alpha-lipoic acid induced a significant decrease in heart weight as compared to that of control or AL groups (Fig. 3A). The heart to body weight ratio, which estimates cardiac hypertrophy, was significantly (P < 0.05) increased in the DOX group (Fig. 3B).

3.4. Cardiac parameters evaluated in vivo by left ventricle catheterization

Heart rate (HR) was not influenced by doxorubicin treatment at D40 and D70. Left ventricular developed pressure (LVDP), β dP/dt and Δ dP/dt were not modified 1 month after the end of treatment (D40) but at D70, we observed in animals treated with doxorubicin alone (DOX) or in combination with alpha-lipoic acid (DOXeAL) a significant decrease (P \leq 0.034) in β dP/dT (Table 3).

3.5. Blood/plasma parameters

3.5.1. Hematocrit (Ht)

As shown in Fig. 4, a cumulative dose of 10 mg/kg of doxorubicin over 10 days (D10) induced a decrease in Ht values and the emergence of anemia in rats of the DOX and DOXeAL groups. This anemia persisted for 15 days (D25) after the end of the treatment. Subsequently, during the period of surveillance, Ht values were similar in the four groups of rats.

Table 2
Histological analysis of liver tissues collected 2 months (D70) after the end of the treatment in the control group (C), alpha-lipoic acid group (AL), doxorubicin group (DOX) and doxorubicin β alpha-lipoic acid group (DOXeAL).

	Histological tissue modifications					
	Condensation	Necrosis	Sinusoidal dilation	Inflammation	Neo-ductules	Thrombosis
C	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2
AL	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2
DOX	2/2	1/2	2/2	0/2	0/2	0/2
DOXeAL	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2

Please cite this article in press as: S. Ghibu, et al., General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid, Biochimie (2011), doi:10.1016/j.biochi.2011.02.015

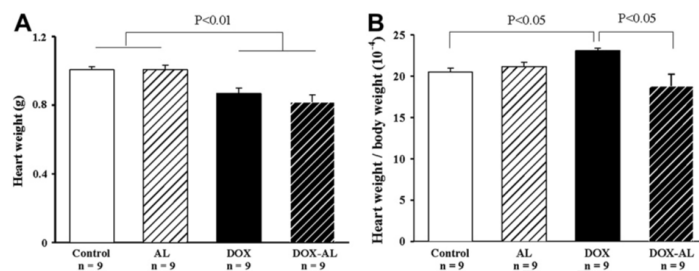


Fig. 3. Heart weight [A] and heart to body weight ratio [B] in the control group (C), alpha-lipoic acid group (AL), doxorubicin group (DOX) and doxorubicin p alpha-lipoic acid group (DOXeAL), 2 months (D70) after the end of the treatment. A: P < 0.01: DOX and DOXeAL vs. C and AL B: P < 0.05: DOX vs. C and P < 0.05: DOXeAL vs. DOX.

3.5.2. Plasma hydroperoxide (ROOH) concentration determined by the "FORT" test

Ten days of treatment with alpha-lipoic acid (50 mg/kg/day) induced a significant decrease in plasma hydroperoxide levels in the AL group as compared with the control group (1.36 \pm 0.08 vs. 2.44 \pm 0.41 mmol/l H₂O₂, P < 0.05), which was noticeable only after 5 days of treatment in both AL-treated groups. A cumulative dose of 10 mg/kg of doxorubicin led to an increase in ROOH in both DOX and DOXeAL groups in comparison with the AL group. One month after the end of the treatment (D40), levels of plasma hydroperoxides remained higher in animals treated with doxorubicin. This was no longer the case 2 months after the end of the treatment (Fig. 5).

3.5.3. Plasma concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)

Two months after the end of the treatment, plasma levels of TBARs were significantly higher in the DOXeAL group than in the Control and AL groups; while only a tendency (P \approx 0.059) to higher TBARs values was observed in the DOX group (Table 4).

3.5.4. Ascorbate plasma concentrations

One month after the end of the treatment, the plasma concentration of ascorbate was significantly lower in the DOXeAL group than in the AL and Control groups. Two months after the end of the treatment (D70) the decrease in plasma concentrations of ascorbate was more evident in both groups of rats treated with doxorubicin: DOX and DOXeAL and associated with a significant increase in the AFR to ascorbate ratio (Table 4).

3.6. Tissue parameters

3.6.1. Heart tissue TBARs

Two months after the end of the treatment, there was a significant (p 50% P < 0.01) increase in TBARs in the hearts of rats from the DOX and DOXeAL groups (Table 3) compared with the values in tissue samples of C or LA hearts.

Table 3

Heart parameters evaluated in vivo by left ventricle catheterization in the control group (C), alpha-lipoic acid group (AL), doxorubicin group (DOX) and doxorubicin p alpha-lipoic acid group (DOXeAL), 1 month (D40) and 2 months (D70) after the end of the treatment (*P < 0.05: DOX and DOXeAL vs. C).

	1 month				2 months			
	C	AL	DOX	DOXeAL	C	AL	DOX	DOXeAL
HR (beats/min)	350 \pm 13	357 \pm 12	361 \pm 20	376 \pm 14	343 \pm 7	326 \pm 7	302 \pm 26	357 \pm 23.29
LVDP (mmHg)	119 \pm 5	123 \pm 9	128 \pm 9	108 \pm 13	116 \pm 7	106 \pm 6	94 \pm 7	86 \pm 15
p dP/dt	3823 \pm 149	3756 \pm 344	3855 \pm 300	3413 \pm 435	3643 \pm 266	3302 \pm 163	2674 \pm 277*	2583 \pm 487*
Δ p/dt	3419 \pm 173	3483 \pm 447	3705 \pm 435	3231 \pm 502	3403 \pm 305	3113 \pm 191	2475 \pm 315	2330 \pm 530

Please cite this article in press as: S. Ghibu, et al., General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid, Biochimie (2011), doi:10.1016/j.biochi.2011.02.015

566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630

6

S. Ghibu et al. / Biochimie xxx (2011) 1e8

631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695

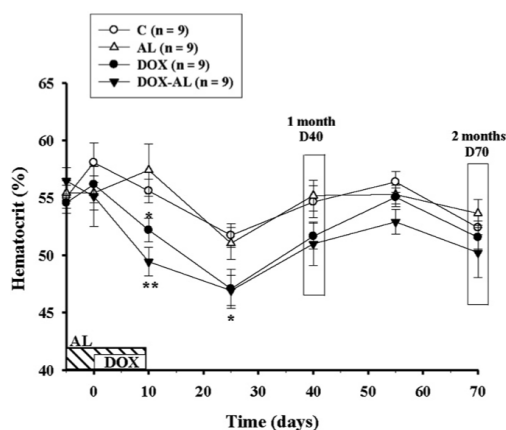


Fig. 4. Evolution of hematocrit throughout the period of study, in the control group (C), alpha-lipoic acid group (AL), doxorubicin group (DOX) and doxorubicin β alpha-lipoic acid group (DOXeAL) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: DOX and DOXeAL vs. C and AL).

ratio was not significantly altered, probably because of the "artificial" increase in body weight due to the accumulation of ascites.

Cardiac functional parameters, measured *in vivo* in our experimental conditions, were affected 2 months after treatment with a cumulative dose of 10 mg/kg doxorubicin, with lower left ventricular contractility (β dP/dt) in DOX and DOXeAL hearts, inducing a non significant reduction in PDVG and in the left ventricular relaxation index (\dot{A} dP/dt). As has already been observed in our laboratory [38], the impairment of contractility is a very late event and is only at its beginning two months after a cumulative dose of 10 mg/kg, while the general condition of the rats is deteriorating so dramatically that it is life threatening and leads to high

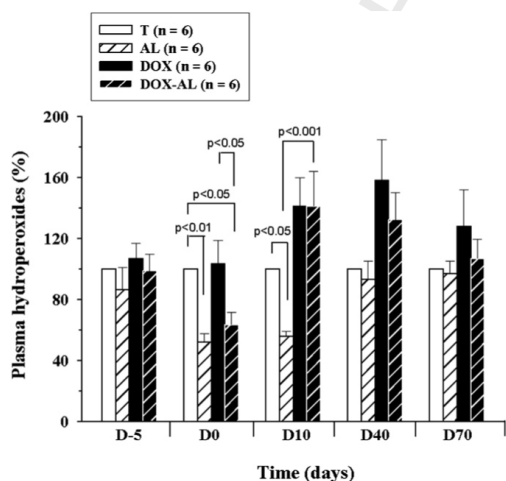


Fig. 5. Evolution of plasma hydroperoxides (ROOH) throughout the period of study in the control group (C), alpha-lipoic acid group (AL), doxorubicin group (DOX) and doxorubicin β alpha-lipoic acid group (DOXeAL).

mortality. Sacco et al. [37] showed that a total cumulative dose of 7.5 mg doxorubicin did not affect PDVG but decreased β dP/dt 13 weeks after the end of treatment. In fact, deterioration in heart contractility could become more evident after cardiac β -adrenergic stimulation with isoprenaline [37].

In our experimental conditions, the addition of alpha-lipoic acid to doxorubicin treatment did not prevent either cardiac alterations or deterioration in the general physical condition. Al-Majed et al. [42] noted a cardioprotective effect of alpha-lipoic acid 48 h after doxorubicin administration. While alpha-lipoic acid combined with doxorubicin might provide some protection for a few days after doxorubicin treatment, there are no studies to confirm or reject this cardioprotective effect in the long term after the end of chemotherapy.

Regarding the assessment of plasma and cardiac oxidative stress, the methods used in this work were various and complex, each with different characteristics of sensitivity and specificity. Plasma lipid peroxidation was assessed as 1) plasma hydroperoxide concentration evaluated during the treatment and at the moment the rats were killed and 2) plasma malondialdehyde (MDA) concentration measured at the time the rats were killed (1 and 2 months after the end of treatment). We noted a significant decrease in plasma levels of hydroperoxide after a cumulative dose of 250 mg/kg alpha-lipoic acid (5 days of treatment). This decrease was maintained until the end of treatment (15 days of treatment with a cumulative dose of 750 mg/kg alpha-lipoic acid) with no evidence of a dose response relationship. In addition, a cumulative dose of 10 mg/kg doxorubicin (10 days of treatment) induced an increase in plasma hydroperoxides; the values were 2.5 times higher than those in the AL group. These results reflect early stress due to circulating free radicals during doxorubicin treatment. On the other hand, 2 months after the end of treatment, plasma TBARS were significantly higher in rats treated with doxorubicin in combination with alpha-lipoic acid (DOXeAL group).

To get a better evaluation of plasma oxidative stress, it was necessary to evaluate the levels of some antioxidant systems. Thus, we determined the plasma concentration of vitamin C by HPLC and the plasma ascorbyl radical level by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Two months after treatment, the plasma concentration of ascorbate was significantly lower in rats treated with doxorubicin alone or in combination with alpha-lipoic acid. This phenomenon can be explained by a decrease in hepatic vitamin C synthesis and by an excess of free radical species production as we previously reported [38].

Evaluation of cardiac oxidative stress by TBARS or by ethidine (DHE) fluorescence showed a significant increase in $O_2^{\cdot-}$ production and in malondialdehyde levels in the DOX and DOXeAL groups, 2 months after doxorubicin administration. In a similar study carried out in our laboratory, cardiac oxidative stress was not evident 8 days after treatment with a cumulative dose of 10 mg/kg doxorubicin [38]. This could confirm that tissue oxidative stress is a late event in the onset of doxorubicin cardiotoxicity.

It is important to note that, in our experimental conditions, that oxidative stress in the plasma or cardiac tissue was not improved by the addition of alpha-lipoic acid to the doxorubicin treatment. Despite this, it is important to remember that alpha-lipoic acid alone significantly decreases the concentration of plasma hydroperoxides, but in combination with doxorubicin it had no beneficial effect. Contrary to our initial hypothesis, the results obtained regarding mortality and the presence of high quantities of ascites indicates that the combination of doxorubicin with alpha-lipoic acid is rather deleterious than beneficial to the parameters evaluated.

In contrast to our results, some experimental studies showed that alpha-lipoic acid administered 24 h before the injection of doxorubicin, once a week over a period of 10e12 weeks, had

696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760

Please cite this article in press as: S. Ghibu, et al., General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid, Biochimie (2011), doi:10.1016/j.biochi.2011.02.015

Table 4

Plasma and cardiac oxidative stress parameters evaluated 1 month (D40) and 2 months (D70) after the end of the treatment in the control group (C), alpha-lipoic acid group (AL), doxorubicin group (DOX) and doxorubicin β alpha-lipoic acid group (DOXeAL) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: DOX and DOXeAL vs. C; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: DOX and DOXeAL vs. AL).

	1 month				2 months			
	C	AL	DOX	DOXeAL	C	AL	DOX	DOXeAL
Plasma TBARs (nmol/g protein)	0.020 \pm 0.001	0.022 \pm 0.001	0.024 \pm 0.002	0.027 \pm 0.003	0.022 \pm 0.001	0.023 \pm 0.001	0.027 \pm 0.001	0.034 \pm 0.003*
Ascorbate (nM)	43.7 \pm 4.1	42.8 \pm 2.8	38.1 \pm 4.7	27.0 \pm 4.6*	42.4 \pm 3.6	39.3 \pm 4.9	22.6 \pm 2.1***y	22.9 \pm 5.0***y
AFR/ascorbate (AU)/(nM)	0.063 \pm 0.003	0.065 \pm 0.007	0.080 \pm 0.019	0.084 \pm 0.006	0.051 \pm 0.004	0.054 \pm 0.004	0.073 \pm 0.006*	0.071 \pm 0.008*
Tissue TBARs (nM/g cardiac tissue)	19.6 \pm 1.9	16.1 \pm 1.4	19.4 \pm 1.8	21.9 \pm 2.4	13.9 \pm 1.4	15.9 \pm 1.6	21.7 \pm 3.3***y	26.1 \pm 2.2***y
DHE 10 ^{A4} (%fluorescence/nucleus)	3.10 \pm 0.74	2.70 \pm 0.74	7.90 \pm 0.25*	4.90 \pm 0.68	4.60 \pm 0.10	4.70 \pm 0.11	9.10 \pm 0.18**y	9.40 \pm 0.19**y

a beneficial effect in renal [43,44] and testicular toxicity [45], but did not mention major side-effects. The ineffectiveness of alpha-lipoic acid in preventing doxorubicin cardiotoxicity found in our study could be due to the inhibition of compensatory mechanisms activated at the start of chemotherapy. Indeed, there is a long period of time during which there are no modifications in oxidative stress status or in cardiac contractile parameters. This latent period without symptoms might be secondary to the involvement of compensatory mechanisms that are triggered quite early [35,46]. It is not easy to evaluate the specific pharmacologic actions of an antioxidant. For instance, it is known that antioxidants can prevent the cardioprotective mechanisms triggered by ischemic preconditioning, whereas the administration of a free radical-generating system may mimic ischemic preconditioning [47e49]. It is worth mentioning, though, that in our protocol, the alpha-lipoic acid was administered 5 days prior to the introduction of doxorubicin. The reactive oxygen or nitrogen species formed after the first doses of anthracyclines might induce cellular protective pathways that are unfortunately overwhelmed later by the following administrations of anthracycline. Then, pre-treatment with an antioxidant such as alpha-lipoic acid might paradoxically reinforce the toxic effects of doxorubicin, not only for the oxidative stress levels but also for cellular injury. In addition, a possible negative interaction between the two substances cannot be excluded. Further work is obviously needed to confirm or rule out these hypotheses, and to explore more thoroughly the timing of doxorubicin and alpha-lipoic acid administration or the dosages used.

5. Conclusion

In conclusion, this study confirmed that treatment with doxorubicin quickly deteriorated the general state of the animals while the cardiac problems and oxidative stress in the plasma and tissue were more obvious two months after completion of the treatment. Contrary to our initial hypothesis, the administration of alpha-lipoic acid in combination with doxorubicin did not have a beneficial effect on heart function or on general oxidative stress, and led to a greater accumulation of ascitic fluid. The "beneficial" antioxidant properties of alpha-lipoic acid clearly appear to depend on the experimental conditions, and the cardioprotective potential of some antioxidant molecules in the context of chemotherapy should be approached with caution.

Conflict of interest statement

The authors declare to have no personal, financial or other relationships with other people or organizations within 3 years of beginning the work submitted that could inappropriately influence, or be perceived to influence, the work submitted.

Funding source statement

This work was supported by grants from the French Ministry of Research, the Conseil Régional de Bourgogne, the Association de

Cardiologie de Bourgogne and the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

Acknowledgments

We wish to thank Philip Bastable for English assistance.

References

- [1] D.M. Green, Y.A. Grigoriev, B. Nan, J.R. Takashima, P.A. Norkool, G.J. D'Angio, N.E. Breslow, Congestive heart failure after treatment for Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study group, *J Clin. Oncol.* 19 (2001) 1926e1934.
- [2] L.C. Kremer, E.C. van Dalen, M. Offringa, J. Ottenkamp, P.A. Voute, Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study, *J Clin. Oncol.* 19 (2001) 191e196.
- [3] R.E. Sully, S.E. Lipshultz, Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer, *Cardiovasc. Toxicol.* 7 (2007) 122e128.
- [4] A. Giantris, L. Abdurrahman, A. Hinkle, B. Asselin, S.E. Lipshultz, Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 27 (1998) 53e68.
- [5] S.E. Lipshultz, N. Rifai, V.M. Dalton, D.E. Levy, L.B. Silverman, S.R. Lipsitz, S.D. Colan, B.L. Asselin, R.D. Barr, L.A. Cavali, C.A. Hurwitz, A. Moghrabi, Y. Samson, M.A. Schorin, R.D. Gelber, S.E. Sallan, The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 145e153.
- [6] S.M. Swain, P. Vici, The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review, *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 130 (2004) 1e7.
- [7] M. Tokarska-Schlattner, M. Zaugg, C. Zuppinger, T. Wallimann, U. Schlattner, New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics, *J Mol. Cell. Cardiol.* 41 (2006) 389e405.
- [8] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 185e229.
- [9] E.L. De Beer, A.E. Bottone, E.E. Voest, Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review, *Eur. J. Pharmacol.* 415 (2001) 1e11.
- [10] S. Delemasure, C. Vergely, M. Zeller, Y. Cottin, L. Rochette, Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclines. From basic concepts to clinical data, *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)* 55 (2006) 104e112.
- [11] T. Smunek, M. Sterba, O. Popelova, M. Adamcova, R. Hrdina, V. Gerstl, Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron, *Pharmacol. Rep.* 61 (2009) 154e171.
- [12] M.I. Gharib, A.K. Burnett, Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis, *Eur. J. Heart Fail.* 4 (2002) 235e242.
- [13] N. Sveski-Iliskovic, M. Hill, D.A. Chow, P.K. Singal, Probulcol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect, *Circulation* 91 (1995) 10e15.
- [14] C. Vergely, S. Delemasure, Y. Cottin, L. Rochette, Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclines: from basic concepts to clinical data, *Heart Metab.* 35 (2007) 1e7.
- [15] K.A. Wouters, L.C. Kremer, T.L. Miller, E.H. Herman, S.E. Lipshultz, Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies, *Br. J. Haematol.* 131 (2005) 561e578.
- [16] M. Marty, M. Espie, A. Lombart, A. Monnier, B.L. Rapoport, V. Stahlova, Multicenter randomized phase III study of the cardioprotective effect of dexrazoxane (Cardioxane) in advanced/metastatic breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy, *Ann. Oncol.* 17 (2006) 614e622.
- [17] B. Anderson, Dexrazoxane for the prevention of cardiomyopathy in anthracycline treated pediatric cancer patients, *Pediatr. Blood Cancer* 44 (2005) 584e588.

Please cite this article in press as: S. Ghibu, et al., General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid, *Biochimie* (2011), doi:10.1016/j.biochi.2011.02.015

- 891 [18] L.R. Wiseman, C.M. Spencer, Dexrazoxane. A review of its use as a car-
892 dioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy,
893 *Drugs* 56 (1998) 385e 403.
- 894 [19] L. Ebl, H. Hrstkova, I. Tomaskova, J. Michalek, Late anthracycline cardiotoxi-
895 cidity protection by dexrazoxane (ICRF-187) in pediatric patients: echocar-
896 diographic follow-up, *Support. Care Cancer* 14 (2006) 128e 136.
- 897 [20] G.P. Blewenga, G.R. Haenen, A. Bast, The pharmacology of the antioxidant
898 lipoic acid, *Gen. Pharmacol.* 29 (1997) 315e 331.
- 899 [21] S. Ghibu, C. Richard, S. Delemasure, C. Vergely, C. Mogosan, A. Muresan, An
900 endogenous dithiol with antioxidant properties: alpha-lipoic acid, potential uses
901 in cardiovascular diseases, *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)* 57 (2008) 161e 165.
- 902 [22] J.M. May, Z.C. Qu, D.J. Nelson, Uptake and reduction of alpha-lipoic acid by
903 human erythrocytes, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 1135e 1142.
- 904 [23] A. Biliska, L. Wlodek, Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol. Rep.* 57
905 (2005) 570e 577.
- 906 [24] K.J. Cho, H. Moini, H.K. Shon, A.S. Chung, L. Packer, Alpha-lipoic acid decreases
907 thiol reactivity of the insulin receptor and protein tyrosine phosphatase 1B in
908 3T3-L1 adipocytes, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 849e 858.
- 909 [25] D. Ziegler, M. Hanefeld, K.J. Ruhnau, H. Hasche, M. Lobisch, K. Schutte,
910 G. Kerum, R. Malessa, Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy
911 with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized
912 controlled trial (ALADIN III Study). ALADIN III Study Group, *Alpha-Lipoic Acid*
913 *in Diabetic Neuropathy*, *Diabetes Care* 22 (1999) 1296e 1301.
- 914 [26] D. Ziegler, A. Ametov, A. Barinov, P.J. Dyck, I. Gurieva, P.A. Low, U. Munzel,
915 N. Yakhno, I. Raz, M. Novosadova, J. Maus, R. Samigullin, Oral treatment with
916 alpha-lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: the SYD-
917 NEY 2 trial, *Diabetes Care* 29 (2006) 2365e 2370.
- 918 [27] T. Kunt, T. Forst, A. Wilhelm, H. Tritschler, A. Pfuetzner, O. Harzer,
919 M. Engelbach, A. Zschaebitz, E. Stofft, J. Beyer, Alpha-lipoic acid reduces
920 expression of vascular cell adhesion molecule-1 and endothelial adhesion of
921 human monocytes after stimulation with advanced glycation end products,
922 *Clin. Sci. (Lond.)* 96 (1999) 75e 82.
- 923 [28] W.J. Zhang, B. Frei, Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB
924 activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial
925 cells, *FASEB J.* 15 (2001) 2423e 2432.
- 926 [29] S. Ghibu, B. Lauzier, S. Delemasure, S. Amoureux, P. Scard, C. Vergely,
927 A. Muresan, C. Mogosan, L. Rochette, Antioxidant properties of alpha-lipoic
928 acid: effects on red blood membrane permeability and adaptation of isolated
929 rat heart to reversible ischemia, *Mol. Cell. Biochem.* 320 (2009) 141e 148.
- 930 [30] L. Holmquist, G. Stuchbury, K. Berbaum, S. Muscat, S. Young, K. Hager, J. Engel,
931 G. Munch, Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related
932 dementias, *Pharmacol. Ther.* 113 (2007) 154e 164.
- 933 [31] U. Cakatay, Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydro-lipoic acid,
934 *Med. Hypotheses* 66 (2006) 110e 117.
- 935 [32] H. Moini, L. Packer, N.E. Saris, Antioxidant and prooxidant activities of alpha-
936 lipoic acid and dihydro-lipoic acid, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182 (2002) 84e 90.
- 937 [33] L. Lorgis, M. Zeller, G. Dentan, P. Scard, C. Richard, P. Buffet, I. L'Huillier,
938 J.C. Beer, Y. Cottin, L. Rochette, C. Vergely, The free oxygen radicals test (FORT)
939 to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial
940 infarction, *Atherosclerosis* (2010).
- 941 [34] C. Vergely, V. Maupoil, M. Benderitter, L. Rochette, Influence of the severity of
942 myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl free radical release and on
943 post-ischemic recovery during reperfusion, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998)
944 470e 479.
- 945 [35] J. Robert, Prediclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory
946 animals: predictiveness and pitfalls, *Cell Biol. Toxicol.* 23 (2007) 27e 37.
- 947 [36] K. Teraoka, M. Hirano, K. Yamaguchi, A. Yamashina, Progressive cardiac
948 dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats, *Eur. J. Heart Fail.* 2
949 (2000) 373e 378.
- 950 [37] G. Sacco, R. Giampietro, E. Salvatorelli, P. Menna, N. Bertani, G. Graiani,
951 F. Animati, C. Goso, C.A. Maggi, S. Manzini, G. Minotti, Chronic cardiotoxicity of
952 anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and
953 reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation
954 and reactivity, *Br. J. Pharmacol.* 139 (2003) 641e 651.
- 955 [38] C. Richard, B. Lauzier, S. Delemasure, S. Talbot, S. Ghibu, B. Collin, J. Senecal,
956 F. Menetrier, C. Vergely, R. Couture, L. Rochette, Effects of angiotensin-1
957 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor
958 expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats, *J. Cardiovasc.*
959 *Pharmacol.* 52 (2008) 278e 285.
- 960 [39] S.Y. Kim, S.J. Kim, B.J. Kim, S.Y. Rah, S.M. Chung, M.J. Im, U.H. Kim, Doxor-
961 ubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺
962 increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes, *Exp. Mol. Med.* 38
963 (2006) 535e 545.
- 964 [40] J.L. Reeve, E. Szegezdi, S.E. Logue, T.N. Chonghaile, T. O'Brien, T. Ritter,
965 A. Samali, Distinct mechanisms of cardiomyocyte apoptosis induced by
966 doxorubicin and hypoxia converge on mitochondria and are inhibited by Bcl-
967 xL, *J. Cell. Mol. Med.* 11 (2007) 509e 520.
- 968 [41] R.J. Bennink, M.J. van den Hoff, F.J. van Hemert, K.M. de Bruin, A.L. Spijkerboer,
969 J.L. Vanderheyden, N. Steinmetz, B.L. van Eck-Smit, Annexin V imaging of
970 acute doxorubicin cardiotoxicity (apoptosis) in rats, *J. Nucl. Med.* 45 (2004)
971 842e 848.
- 972 [42] A.A. Al-Majed, A.M. Gdo, O.A. Al-Shabanah, M.A. Mansour, Alpha-lipoic acid
973 ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin, *Pharmacol. Res.* 46
974 (2002) 499e 503.
- 975 [43] K.P. Malarkodi, A.V. Balachandar, P. Varalakshmi, Protective effect of lipoic
976 acid on adriamycin induced lipid peroxidation in rat kidney, *Mol. Cell. Bio-
977 chem.* 247 (2003) 9e 13.
- 978 [44] K.P. Malarkodi, A.V. Balachandar, P. Varalakshmi, The influence of lipoic acid
979 on adriamycin induced nephrotoxicity in rats, *Mol. Cell. Biochem.* 247 (2003)
980 15e 22.
- 981 [45] C. Prahalthan, E. Selvakumar, P. Varalakshmi, Protective effect of lipoic acid
982 on adriamycin-induced testicular toxicity, *Clin. Chim. Acta* 360 (2005)
983 160e 166.
- 984 [46] A.T. Demiryurek, R.M. Wadsworth, Superoxide in the pulmonary circulation,
985 *Pharmacol. Ther.* 84 (1999) 355e 365.
- 986 [47] M. Osada, T. Sato, S. Komori, K. Tamura, Protective effect of preconditioning on
987 reperfusion induced ventricular arrhythmias of isolated rat hearts, *Cardiovasc.*
988 *Res.* 25 (1991) 441e 444.
- 989 [48] M.C. Toufeksian, S. Tanguy, A. Jounet, J.G. de Leiris, F.R. Boucher, Role of
990 reactive oxygen species in cardiac preconditioning: study with photoactivated
991 Rose Bengal in isolated rat hearts, *Free Radic. Res.* 33 (2000) 393e 405.
- 992 [49] D.K. Das, N. Maulik, M. Sato, P.S. Ray, Reactive oxygen species function as
993 second messenger during ischemic preconditioning of heart, *Mol. Cell. Bio-
994 chem.* 196 (1999) 59e 67.

Please cite this article in press as: S. Ghibu, et al., General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of car-
dioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid, *Biochimie* (2011), doi:10.1016/j.biochi.2011.02.015

II.3.-Oxidative stress and myocardial gene alterations associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats persist for two months after treatment cessation

Objectifs

Notre troisième travail expérimental complète nos 2 premiers travaux. Comme évoqué dans l'introduction, le développement d'une cardiomyopathie aux Anthracyclines est multifactoriel. Le mécanisme physiopathologique principal repose sur la production de radicaux libres conduisant à des altérations morphologiques et fonctionnelles cellulaires multiples. Cependant, l'apparition d'anomalies de structure et d'expression de certains gènes myocytaires, sous l'action des Anthracyclines, participe à l'installation et à la chronicisation de cette cardiomyopathie. Les objectifs de cette nouvelle étude étaient donc:

- de confirmer l'implication du stress oxydant dans l'altération de la fonction cardiaque à 2 mois d'un traitement par Anthracyclines.
- d'apprécier les modifications architecturales du tissu cardiaque et de ses vaisseaux, 2 mois après l'injection de Doxorubicine.
- d'étudier, parallèlement au stress oxydant, l'expression de certains gènes myocytaires à distance de l'administration d'Anthracyclines.

Résultats

L'analyse des paramètres hémodynamiques, obtenus par le cathétérisme cardiaque, 2 mois après l'injection de Doxorubicine, a confirmé l'altération de la fonction pompe du cœur des rats traités par Anthracyclines, avec une atteinte portant essentiellement sur le ventricule gauche. L'étude histologique du tissu myocardique a montré la présence d'un dépôt de collagène de type I et de type III significativement plus important chez les animaux traités par Doxorubicine que chez les rats non traités et prédominant autour des branches de division des artères coronaires et dans l'adventice de leur paroi ($p < 0,05$). L'étude du stress oxydant et tissulaire a retrouvé des taux de TBARs plasmatiques et tissulaires significativement plus hauts chez les rats traités par Doxorubicine par rapport aux taux mesurés chez les rats non traités (respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,05$). La concentration plasmatique d'acide ascorbique apparaissait significativement plus basse dans le groupe des rats traités par rapport à celle des rats non traités par Anthracyclines ($p < 0,01$). L'étude quantitative de l'ARN messager des gènes myocytaires de l'ANF et de la MHC β a montré une augmentation de la production de

ces 2 ARN messagers au niveau du cœur des rats ayant reçu de la Doxorubicine par rapport à celle des rats « contrôles » ($p < 0,001$). Parallèlement, il a été retrouvé, dans cette population de rats traités, une diminution significative de la production d'ARN messenger myocytaire codant pour la Serca 2a ($p < 0,001$) contrairement à l'étude de l'ARN messenger codant pour le VEGF qui n'a pas retrouvé de différence entre les rats ayant reçu ou non de la Doxorubicine.

TITLE PAGE

Oxidative stress and myocardial gene alterations associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats persist for two months after treatment cessation¹

Carole Richard, Steliana Ghibu, Stéphanie Delemasure-Chalumeau, Jean-Claude Guillard, Christine Des Rosiers, Marianne Zeller, Yves Cottin, Luc Rochette, Catherine Vergely

Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, EA 2979, IFR Santé-STIC, Facultés de Médecine et Pharmacie, 7 bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France (C.R., S.D.C., J.C.J, M.Z., Y.C., L.R., C.V.); Department of Pharmacology, Physiology and Physiopathology; Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania (S.G.); Département de nutrition et Institut de Cardiologie de Montréal, Université de Montréal, Québec, Canada (C.D.R.).

RUNNING TITLE PAGE

Running title: Genes' alterations in anthracycline cardiotoxicity

Corresponding author: Pr. Catherine VERGELY, Laboratoire de Physiopathologie & Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, EA 2979, IFR Santé-STIC, Facultés de Médecine & Pharmacie, 7 bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France
phone: (+33) 3 80 39 34 60; fax: (+33) 3 80 39 32 93; email: cvergely@bourgogne.fr

Number of text pages: 26

Number of figures: 4

Number of tables: 4

Number of references: 36

Number of words in the abstract: 247

Number of words in the Introduction: 465

Number of words in the Discussion: 1476

List of non-standard abbreviations:

ANF: atrial natriuretic factor; AFR: ascorbyl free radical; β -MHC: myosin heavy chain β ; DHE: dihydroethidium; DOX: doxorubicin; +dP/dT: left ventricular contractility; -dP/dT: left ventricular relaxation; ESR: electron spin resonance; HMOX: heme oxygenase-1; HR: heart rate; LVEDP: left-ventricular end-diastolic pressure; LVDP: left-ventricular developed pressure; LVSP: left-ventricular systolic pressure; qPCR : quantitative polymerase chain reaction ; SERCA2a: sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} ATPase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; VEGFa: vascular growth factor

Recommended section assignment: Cardiovascular

Abstract

The molecular mechanisms underlying doxorubicin (DOX)-induced cardiomyopathy include alterations in cardiomyocytes oxidative stress status as well as in gene expression. While such alterations have been reported during *in vivo* DOX treatment of animals, it remains to be clarified whether they persist following treatment cessation. To address this question, rats were injected either with saline (1 mL/kg/day/i.p.; control: C) or DOX (1 mg/kg/day/i.p.) for 10 days (D0 to D9) and, 70 days later (D70), cardiac functional parameters were evaluated *in vivo* by left ventricular catheterization. Hearts were also harvested for (i) histological analyses as well as measurements of (ii) oxidative stress parameters by various techniques, and (iii) gene expression by qPCR of markers of cardiac pathological remodeling, namely atrial natriuretic factor (ANF), myosin heavy chain β (β -MHC), vascular growth factor (VEGFa) and sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} ATPase (SERCA2a). Compared with controls, DOX-treated rats displayed marked alterations in most parameters even two months after cessation of treatment. These included (i) lower left ventricular contractility (+dP/dt), (ii) increased levels of plasma and myocardial oxidative stress markers, namely TBARS or dihydroethidium (DHE) fluorescence; as well as (iii) markedly altered transcript levels for all measured markers of cardiac remodeling, except VEGFa. These changes correlated significantly with +dP/dt values assessed in the two groups of animals. In conclusion, this study demonstrated that, as much as two months after cessation of DOX treatment, cardiac alterations persist, reflecting increased oxidative stress as well as pathological remodeling, the latter being linked to the development of contractile dysfunction.

INTRODUCTION

Doxorubicin is an anthracycline anti-neoplastic drug used in the treatment of a wide range of solid tumors and of leukemia in children and adults. Despite its good therapeutic results, the clinical use of doxorubicin during chemotherapy is limited by the development of acute, sub-acute, early chronic or late chronic cardiotoxicity (Kremer et al., 2001). Cardiac alterations become more obvious several years after the end of the treatment and may occur as dilated cardiomyopathy leading to congestive heart failure (Giantris et al., 1998; Scully and Lipshultz, 2007).

The different lines of evidence have provided putative mechanisms, but the molecular mechanisms involved in chronic anthracycline cardiotoxicity remain a major topic of discussion. The antitumor activity of DOX is probably distinct from the mechanisms of its cardiotoxicity. Several aspects of this phenomenon, such as apoptosis, alteration of iron and calcium homeostasis have been described, but the exact mechanism is not yet been fully understood. Oxidative stress is believed to be an important pathway in the cardiac side-effects of anthracycline therapy (Tokarska-Schlattner et al., 2006). It is widely known that superoxide anion free radical ($O_2^{\bullet-}$) is generated during the “redox cycling” of anthracycline or after oxido-reduction processes taking place inside the anthracycline-iron complex. Then, $O_2^{\bullet-}$ is transformed into hydroxyl radical (HO^{\bullet}) in the presence of transition metals or forms peroxynitrite ($ONOO^-$) in the presence of nitric oxide ($^{\bullet}NO$). These oxidants induce cellular injury (Delemasure et al., 2007; Simunek et al., 2009). The molecular mechanisms involved in DOX-induced cardiomyopathy have not yet been fully identified but it is likely that they are associated with alterations in the structure and gene expression of cardiac myocytes. In this way, it has been reported that DOX induced effects on L-type calcium channels (Campbell et al., 1996), sarcoplasmic reticulum ATPase (SERCA) (Arai et al., 2000), ryanodine receptors (Wang and Korth, 1995) and Na^+/Ca^+ exchanger activity (Goldhaber,

1996). On the other hand, it has also been reported that some pathological cardiac dysfunctions such as hypertrophy were associated with the up-regulation of fetal genes such as atrial natriuretic factor (ANF) and isoforms of myosin heavy chain (MHC) (Ritter and Neyses, 2003; Van den Bosch et al., 2006). Early alterations in heart gene expression profiles associated with cardiotoxicity have been studied *in vitro* and *in vivo* (Thompson et al., 2010). Using microarrays, Berthiaume and Wallace (Berthiaume and Wallace, 2007) studied global gene expression changes occurring in rats' hearts 5 weeks after sub-chronic DOX treatment. The major findings of this study were a decrease in the expression of genes governing fatty acid metabolism. But to our knowledge, there have been no specific studies on oxidative stress and gene expression a long time after the end of *in vivo* treatment with DOX in an animal model.

In this context, the aims of our work were to clarify the role of oxidative stress and the expression of certain genes coding for proteins likely to be implicated in DOX-induced cardiac injury two months after cessation of treatment, and to determine the functional and cellular parameters in the plasma and the myocardium.

METHODS

Animals and experimental protocol

The local ethics committee approved the experimental protocol and the investigators complied with authorization 6007 from the French government, which agrees with the Guide of Care and use of Laboratory Animals published by US National Institutes for Health.

For the purpose of our study, male Wistar rats (Charles-River, L'Abresle, France; 300-350 g at the beginning of the experiment) were divided into 2 groups.

In the control group (C, n=8), rats received saline solution: 1 mL/kg/day intraperitoneally (i.p.) for 10 days; from day 0 (D-0) to day 9 (D9).

In the doxorubicin-treated group (DOX, n=8), rats were injected i.p. with 1 mg/kg/day DOX (Adriamycin®, Pfizer, Paris, France) for 10 days, from day 0 (D0) to D9. A total dose of 10 mg/kg doxorubicin was administered over the 10-day period.

The body weight of the rats was measured daily during the period of treatment (D0 to D9), then every 10 days. Moreover, food and water consumption was recorded. Plasma concentrations of lipid peroxides were measured.

At the end of the study, 60 days after the end of the treatment (D70) heart functional parameters were evaluated *in vivo* by left ventricular catheterization.

Heart functional parameters measured *in vivo*

The rats were anaesthetized with sodium thiopental (60 mg/kg, i.p.) and heparinized (500 IU/kg). Once the thorax had been shaved, a catheter connected to a pressure transducer, was inserted into the left ventricle through chest wall in order to measure the heart rate (HR) and left-ventricular pressures (left-ventricular end-diastolic pressure: LVEDP, left-ventricular systolic pressure: LVSP and left-ventricular developed pressure: LVDP = LVSP-LVEDP)

during the first minute of cardiac catheterization. Left-ventricle contractility was expressed as $+dP/dt$ and left-ventricle relaxation as $-dP/dt$.

At the end of the study, blood was taken by cardiac puncture, centrifuged and the plasma was immediately frozen in liquid nitrogen. The hearts were excised, cut into segments and frozen.

Histology

Collagen detection. The hearts of 3 controls and of 3 DOXO-treated rats were harvested for histological analyses. The heart samples were snap-frozen in isopentane then in OCT compound. Five- μm -thick sections were cut using a microtome (CM3050S, Leica microsystems, Germany) and were stained using the Sirius Red protocol (0.1% Direct Red 80 in saturated picric acid solution), which is specific to fibrillar collagens (collagen I and III). Randomly selected fields were evaluated under a polarized-light microscope (Eclipse 600, Nikon, Champigny-Sur-Marne, France) connected to a digital video camera (Tri CCD, Sony, France). The quantity of collagen was measured using Visilog software (Noesis, France) and expressed as the ratio of the mean area of collagen to the total area.

Superoxide Production. In the presence of superoxide, ethidine, a fluorescent compound, is formed from dihydroethidium (DHE) and thus allows quantification of superoxide production. Frozen heart tissues were fixed for 10 min in acetone. Slides were incubated in a light-protected humidified chamber at room temperature with DHE (5 μM) for 5 min. The slides were immediately analyzed with a computer-based digitizing image system (Microvision, France) using a fluorescent microscope (Eclipse 600, Nikon, France) connected to a video camera (TriCCD, Sony, France). Fluorescence was detected at 590 nm and carried forward to the nuclear number. Results were expressed in fluorescence intensity/nuclear number.

Blood/plasma determinations

Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). Plasma lipid peroxides were measured using a colorimetric reaction with thiobarbituric acid. 1.5 mL of trichloroacetic acid/thiobarbituric acid/hydrochloric acid solution was added to 500 µL of plasma. The color of the thiobarbituric acid pigment was developed in a water bath at 100°C for 15 min. After cooling with ice to room temperature, 1 mL of 70% trichloroacetic acid was added. After 1h 30, the tubes were centrifuged and the color of TBARS layers was measured at 553 nm. The absorbance values were compared with a standard curve. Results were expressed in µmoles/g proteins; plasma protein was determined according to the Bradford method (Ghibu et al., 2009). Plasma TBARS were assessed only at the end of the study.

Plasma ascorbyl free radical (AFR) determinations by electron spin resonance (ESR) spectroscopy. Thirty-five µL of plasma samples were inserted into a quartz capillary tube, which was placed in an HS cavity in order to analyze them at room temperature with a Bruker EMX-100 X-band spectrometer (Wissembourg, France). The following parameters were selected for optimal detection of AFR (Vergely et al., 1998): modulation frequency: 100 kHz, amplitude modulation: 0.8 G, microwave power: 40 mW, microwave frequency: 8.5 GHz, conversion time: 40 ms, time constant: 327 ms, scan time: 41 s, gain: $5 \cdot 10^5$, number of scans: 6. The height of AFR signal intensity was measured and expressed in arbitrary units (AU).

Tissue determinations

Determination of cardiac Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARSs) Heart lipid peroxides were measured using a colorimetric reaction with thiobarbituric acid. The hearts were homogenized in ice-cold phosphate buffered saline (0.05 M, pH 7). Then, 1.5 mL

of trichloroacetic acid/thiobarbituric acid/hydrochloric acid solution was added (see previously). Results were expressed in $\mu\text{M/g}$ cardiac tissue.

mRNA levels assessed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Freeze-clamped hearts were used to assess mRNA levels for selected marker genes (listed in Table 1) that reflect cardiac remodeling, namely atrial natriuretic factor (ANF), myosin heavy chain β (β -MHC), vascular endothelial growth factor (VEGFa) and sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} ATPase (SERCA2a), as well as a marker of oxidative stress-induced adaptive response, namely the TF Nrf2 gene, heme oxygenase-1 (HMOX). Gene-specific primer pairs were designed (Beacon Designer 5.0 program) on the basis of rat sequences available in *GenBank*. Total RNA was extracted with Qiagen RNeasy Plus columns, quantified by an Agilent BioAnalyzer 2100, and assessed by reverse transcription, followed by real-time qPCR, as described previously (Lauzier et al., 2011). Cycling was achieved in a MX3005p cycler (Stratagene, Mississauga, Ontario, Canada); conditions: 95°C for 10 min and 46 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s.

Statistical analysis

All data are expressed as means \pm S.E.M. To compare the groups at 2 months after the end of treatment, statistical analyses were performed with the one-factor analysis of variance (ANOVA) test (SigmaStat); ANOVA was followed, if necessary, by a Newman-Keuls test. To compare the evolution of parameters throughout the period of study (period of treatment and period of observation) we used a two-factor repeated measures analysis of variance (ANOVA) test (SigmaStat). Significance was established at a value of $P < 0.05$.

RESULTS

Body and heart weights, heart weight to body weight ratio

In the rats, DOX induced a significant loss of body weight starting from the 3rd day of treatment. After interruption of treatment, there was a trend towards recovery of body weight with kinetics identical to those of control rats.

Two months (D70) after the end of the treatment, the hearts of DOX-treated rats weighed significantly less than control hearts. The heart to body weight ratio, which estimates cardiac hypertrophy, was significantly ($P < 0.05$) increased in the DOX group (Table 2).

Cardiac parameters evaluated *in vivo* by left ventricle catheterization

Heart rate (HR) was not affected by DOX treatment at D70 (Table 3). However, left ventricular developed pressure (LVDP), +dP/dT and -dP/dT were modified 2 months after the end of treatment, animals treated with DOX had significantly lower +dP/dT, -dP/dT and LVDP than controls. These deleterious effects were observed in the left ventricle. The effects in the right ventricle were not significant (data not shown).

Histology

Collagen detection. Sirius Red staining of heart sections showed apparent collagen type I and III deposition in the left ventricle (Figures 1 and 2). The most consistently and severely affected areas occurred around the branches of the coronary vessels. The main histological alterations in vessels are shown in Figure 1A. DOX increased quantities of collagen in the arterial adventitia: DOX ($293 \pm 98\%$) as compared to Controls ($124 \pm 55\%$) group ($p < 0.05$) (Figure 2A). However, no difference was found between the DOX and control group for collagen content in the subepicardial regions of the left-ventricular myocardium (Figure 1B

and 2B). In contrast, there were focal morphological changes that could be related to the formation of edema.

Heart tissue superoxide anion production. Two months after the end of the treatment, the production of $O_2^{\bullet-}$ in heart tissue was significantly ($p < 0.05$) higher in the group of rats treated with DOX than in the Control group (Table 4).

Blood/plasma parameters

Plasma concentrations of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). Two months after the end of the treatment, the plasma level of TBARS was significantly higher in the DOX group than in the Control group (Table 4).

Ascorbate radicals (AFR) and AFR/Ascorbate ratio in plasma. There was a significant decrease in plasma concentrations of ascorbate in the group of rats treated with DOX, associated with a significant increase in the AFR to ascorbate ratio (Table 4).

Tissue parameters

Heart tissue TBARS. Two months after the end of the treatment, levels of TBARS in the hearts of rats from the DOX group were significant higher (+50%, $P < 0.05$) than those in Control hearts (Table 4).

Cardiac transcript levels for selected gene markers of cardiac remodeling. Compared to control hearts, the hearts from DOX-treated rats displayed markedly altered mRNA levels for markers of cardiac remodeling (Figure 3), namely ANF and β -MHC (increased; respectively 4.8 and 3.2 fold), and SERCA2a (decreased; -25%) ($p < 0.001$). There was no difference, however, for VEGFa. Interestingly, there were significant correlations between cardiac gene expressions for ANF, β -MHC and SERCA2a, and +dP/dT for the two groups of animals (Figure 4).

DISCUSSION

In rats, the administration of a cumulative dose of 10 mg/kg DOX induced a decrease in body weight, associated with reduced food consumption. After the end of the treatment, during the two months of the experimental design, body weight and food consumption recovered, but did not reach values of the Control group. In our experiment, the cardiac alterations were more obvious, as revealed by a greater deterioration in heart contractility in the rats treated with DOX. This suggests progressive cardiac dysfunction long after exposure to DOX, as is the case in human patients, who may die months or even years after chemotherapy has been stopped.

Two months after the end of treatment, heart weight in the DOX group was lower than in controls. This phenomenon has been described in other studies (Sacco et al., 2003; Richard et al., 2008; Ghibu et al., 2011) and could be explained by the apoptosis of cardiomyocytes (Bennink et al., 2004; Reeve et al., 2007). Two months after the end of treatment, the heart to body weight ratio, an index of cardiac hypertrophy, was higher in the DOX group and was associated with an increase in the semiquantitative scores from the collagen analysis. These results are in accordance with previous studies (Sanchez-Quintana et al., 1994).

In vivo cardiac functional parameters were impaired 2 months after chronic treatment with DOX: with lower left ventricular contractility (+dP/dt) in DOX hearts, which induced a significant reduction in LVDP. As already observed in our laboratory (Richard et al., 2008), the impairment of contractility is a very late event and is only at its beginnings two months after a cumulative dose of 10 mg/kg of DOX.

Plasma and heart lipid peroxidation was assessed as TBARS concentrations at the time the rats were killed. To get a better evaluation of plasma oxidative stress, we determined the plasma concentration of vitamin C by HPLC and the plasma ascorbyl free radical levels by ESR spectroscopy. Two months after the end of the treatment, the plasma concentration of

ascorbate was significantly lower in rats treated with doxorubicin, and this was associated with a significant increase in the AFR to ascorbate ratio. AFR can be considered as an endogenous indicator of oxidative stress and a terminal paramagnetic product of free-radical transformations in the antioxidant defense system (Vergely et al., 1998). The increase in this ratio could be related to the chronic deleterious effects of DOX long after the end of the treatment. In consequence, this phenomenon could be explained by a decrease in hepatic vitamin C synthesis and by an excess production of free radical species, as we previously reported (Richard et al., 2008).

The evaluation of cardiac oxidative stress by TBARs or by dihydroethidium (DHE) fluorescence showed significantly higher levels of $O_2^{\bullet-}$ production and peroxidation in the DOX group. In a similar short-term study carried out in our laboratory, we found no evidence of cardiac oxidative stress 8 days after treatment with a cumulative dose of 10 mg/kg doxorubicin (Richard et al., 2008), confirming that tissue oxidative stress is a late event in doxorubicin cardiotoxicity.

As shown in this study, DOX induces an increase in collagen I and III content in arterial adventitia. Our results provide direct evidence that adventitial tissue may have been affected by DOX; this tissue being a source of inflammatory mediators. In contrast to well-characterized processes of endothelial lesion, changes in the adventitia during DOX treatment have been neglected. Our results are in agreement with an earlier study in rats receiving DOX that reported marked fibrosis associated with morphological changes that could be related to edema and inflammation (Yagmurca et al., 2003). Most studies support the view that an increase in oxidative stress plays a key role in the pathogenesis while others suggest the release of vasoactive mediators and hormones (Takemura and Fujiwara, 2007). It is well documented in clinical studies that the spectrum of cardiotoxicity with anthracycline agents

includes coronary diseases (Swerdlow et al., 2007). Using the isolated-perfused-heart model, we revealed (Delemeasure et al., 2007) prolonged deterioration in coronary flow during treatment anthracyclines.

The molecular mechanisms involved in the deleterious effects of DOX on the heart are complex and remain a matter of controversy (Minotti et al., 2004). Mechanisms that have been suggested include alterations in genes important for the structural integrity and enzymatic function of cardiac and vessel myocytes. These phenomena can lead to inadequate maintenance of contractile function in the heart. In our study, we focused on the possible role of various molecular pathways in relationship with oxidative stress and the development of heart failure. HMOX-1 is one of the three isoforms of heme-oxygenase enzyme that catabolizes the degradation of heme into biliverdin with the production of free iron and carbon monoxide (CO). HMOX-1 is induced by stimuli including agents involved in oxidative stress and serves as protective gene in a wide range of pathological situations (Ryter et al., 2006). In our experimental conditions, we found no modifications of HMOX-1 in the myocardium of animals treated with DOX, even though there was an increase in oxidative stress. The lack of HMOX-1 induction by DOX is surprising, since HMOX-1 is an inducible defense mechanism activated ubiquitously. However, the essential role of HMOX-1 takes place during the acute stress adaptation and, in our experimental conditions, levels were measured long time after the end of DOX-treatment.

VEGF α is a pivotal angiogenic factor in most tumors and also appears to be a mediator of angiogenesis in several other disease conditions (Carmeliet and Jain, 2000). Our data demonstrate that VEGF α is expressed in the heart but that DOX-induced cardiotoxicity was not associated with any change in VEGF α expression. Our results are in accordance with data obtained on the mesenteric area showing that DOX did not significantly affect angiogenesis,

in doses ranging from 1.8 to 10.8 mg/kg/w, even when co-treated with the antioxidant, N-acetylcysteine (Albertsson et al., 2006). It is clear from our present data that the severe cardiac disorders induced by DOX did not result in a modified VEGFa profile.

Pathological cardiac dysfunction has been associated with the up-regulation of fetal genes such as ANF and β -MHC (Izumo et al., 1988; Van den Bosch et al., 2006). The important results of our study on DOX-induced cardiotoxicity concern the modifications of mRNA in the genes ANF, β -MHC and SERCA2a in hearts collected two months after the end of the treatment. We observed a very significant increase in ANF and β -MHC expression associated with a significant decrease in SERCA2a. A positive and significant correlation was found between SERCA2a expression and +dP/dt, while there was a significant negative correlation between ANF expression and +dP/dt in the hearts of the both groups of animals.

The expression of α and β isoforms of MHC genes is developmentally regulated in the myocardium (Lompre et al., 1991). There is growing evidence that the increased expression of β -MHC in the failing ventricle may serve as a compensatory mechanism to increase contractile efficiency by decreasing the tension cost of contraction (Sanbe et al., 2005). It has been reported (de Beer et al., 2000) that chronic DOX treatment significantly increased the ratio of β -MHC to α -MHC in ventricular tissue. Therefore a relationship exists between the decreased contractile performance and the relative increase in β -MHC expression.

Concerning the molecular impact of treatment with DOX on ANF and SERCA2a expression, these effects are related to the progression of cardiac dysfunction. It has been clearly demonstrated that mRNA levels of the sarcoplasmic reticulum calcium pump were lower in failing than in non-failing hearts (Hasenfuss, 1998). A large body of evidence points to the central role of SERCA2a in the modulation of cardiac relaxation. The levels of these calcium-handling proteins are altered in cardiomyopathies (Kranias and Bers, 2007). Our results are in accordance with the concept that DOX-induced cardiotoxicity depends on the

down-regulation of the SERCA pump; SERCA was previously shown to be down-regulated by DOX and by oxidative stress induced by hydrogen peroxide (Arai et al., 2000).

Plasma levels of natriuretic peptides increase in patients with severe coronary heart failure and also in patients with asymptomatic left ventricle dysfunction (Ogawa et al., 2002). ANF and B-type natriuretic peptide are also useful markers of ventricular dysfunction in patients undergoing anthracycline therapy (Okumura et al., 2000). To further investigate the markers of DOX-induced cardiac toxicity in our chronic model, we evaluated the RNA expression levels for the fetal gene, ANF, in the myocardium. We observed a substantial increase in ANF mRNA, and a negative correlation with the +dP/dt in control animals as well as in DOX-treated animals. Our results are in accordance with the few studies on the subject. Experimental heart failure has been associated with increased ANF mRNA in the left ventricle (Goetze et al., 2006). Because of the strong association between cardiomyocytes hypertrophy and the induction of fetal genes, the expression of ANF and β -MHC has often been used as a marker of hypertrophy and heart failure, but it remains unclear why and how the frequent transition from hypertrophy to failure occurs.

In conclusion, this study confirmed that, two months after completion of the DOX treatment, the state of animals had deteriorated and that this was associated with a rise in oxidative stress and a modification in the expression of genes coding for proteins related to the development of cardiac dysfunction.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Conseil Régional de Bourgogne, the Association de Cardiologie de Bourgogne and the Ligue Contre le Cancer.

Authorship Contributions

Participated in Research design: Vergely, Richard, Cottin, Des Rosiers, Rochette, Zeller.

Conducted experiments: Richard, Delemasure-Chalumeau, Ghibu, Des Rosiers.

Contributed new reagents or analytic tools: Guiland, Zeller.

Performed data analysis: Vergely, Richard, Delemasure-Chalumeau, Rochette.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Vergely, Richard, Des Rosiers, Rochette.

References

- Albertsson P, Lennernas B and Norrby K (2006) On metronomic chemotherapy: modulation of angiogenesis mediated by VEGF-A. *Acta Oncol* **45**:144-155.
- Arai M, Yoguchi A, Takizawa T, Yokoyama T, Kanda T, Kurabayashi M and Nagai R (2000) Mechanism of doxorubicin-induced inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene transcription. *Circ Res* **86**:8-14.
- Bennink RJ, van den Hoff MJ, van Hemert FJ, de Bruin KM, Spijkerboer AL, Vanderheyden JL, Steinmetz N and van Eck-Smit BL (2004) Annexin V imaging of acute doxorubicin cardiotoxicity (apoptosis) in rats. *J Nucl Med* **45**:842-848.
- Berthiaume JM and Wallace KB (2007) Persistent alterations to the gene expression profile of the heart subsequent to chronic Doxorubicin treatment. *Cardiovasc Toxicol* **7**:178-191.
- Campbell DL, Stamler JS and Strauss HC (1996) Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol* **108**:277-293.
- Carmeliet P and Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**:249-257.
- de Beer EL, Bottone AE, van Der Velden J and Voest EE (2000) Doxorubicin impairs crossbridge turnover kinetics in skinned cardiac trabeculae after acute and chronic treatment. *Mol Pharmacol* **57**:1152-1157.
- Delemasure S, Sicard P, Lauzier B, Moreau D, Vergely C and Rochette L (2007) Acute administration of epirubicin induces myocardial depression in isolated rat heart and production of radical species evaluated by electron spin resonance spectroscopy. *J Cardiovasc Pharmacol* **50**:647-653.

- Ghibu S, Delemasure S, Richard C, Guillard JC, Martin L, Gambert S, Rochette L and Vergely C (2011) General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid. *Biochimie*.
- Ghibu S, Lauzier B, Delemasure S, Amoureux S, Sicard P, Vergely C, Muresan A, Mogosan C and Rochette L (2009) Antioxidant properties of alpha-lipoic acid: effects on red blood membrane permeability and adaptation of isolated rat heart to reversible ischemia. *Mol Cell Biochem* **320**:141-148.
- Giantris A, Abdurrahman L, Hinkle A, Asselin B and Lipshultz SE (1998) Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. *Crit Rev Oncol Hematol* **27**:53-68.
- Goetze JP, Friis-Hansen L, Rehfeld JF, Nilsson B and Svendsen JH (2006) Atrial secretion of B-type natriuretic peptide. *Eur Heart J* **27**:1648-1650.
- Goldhaber JI (1996) Free radicals enhance Na⁺/Ca²⁺ exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol* **271**:H823-833.
- Hasenfuss G (1998) Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* **37**:279-289.
- Izumo S, Nadal-Ginard B and Mahdavi V (1988) Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:339-343.
- Kranias EG and Bers DM (2007) Calcium and cardiomyopathies. *Subcell Biochem* **45**:523-537.
- Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M, Ottenkamp J and Voute PA (2001) Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study. *J Clin Oncol* **19**:191-196.
- Lauzier B, Merlen C, Vaillant F, McDuff J, Bouchard B, Beguin PC, Dolinsky VW, Foisy S, Villeneuve LR, Labarthe F, Dyck JR, Allen BG, Charron G and Des Rosiers C (2011) Post-

translational modifications, a key process in CD36 function: Lessons from the spontaneously hypertensive rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **51**:99-108.

Lompre AM, Mercadier JJ and Schwartz K (1991) Changes in gene expression during cardiac growth. *Int Rev Cytol* **124**:137-186.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**:185-229.

Ogawa K, Oida A, Sugimura H, Kaneko N, Nogi N, Hasumi M, Numao T, Nagao I and Mori S (2002) Clinical significance of blood brain natriuretic peptide level measurement in the detection of heart disease in untreated outpatients: comparison of electrocardiography, chest radiography and echocardiography. *Circ J* **66**:122-126.

Okumura H, Iuchi K, Yoshida T, Nakamura S, Takeshima M, Takamatsu H, Ikeno A, Usuda K, Ishikawa T, Ohtake S and Matsuda T (2000) Brain natriuretic peptide is a predictor of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Haematol* **104**:158-163.

Reeve JL, Szegezdi E, Logue SE, Chonghaile TN, O'Brien T, Ritter T and Samali A (2007) Distinct mechanisms of cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin and hypoxia converge on mitochondria and are inhibited by Bcl-xL. *J Cell Mol Med* **11**:509-520.

Richard C, Lauzier B, Delemasure S, Talbot S, Ghibu S, Collin B, Senecal J, Menetrier F, Vergely C, Couture R and Rochette L (2008) Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Cardiovas Pharmacol* **52**:278-285.

Ritter O and Neyses L (2003) The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol Med* **9**:313-321.

Ryter SW, Alam J and Choi AM (2006) Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* **86**:583-650.

Sacco G, Giampietro R, Salvatorelli E, Menna P, Bertani N, Graiani G, Animati F, Goso C, Maggi CA, Manzini S and Minotti G (2003) Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation and reactivity. *Br J Pharmacol* **139**:641-651.

Sanbe A, James J, Tuzcu V, Nas S, Martin L, Gulick J, Osinska H, Sakthivel S, Klevitsky R, Ginsburg KS, Bers DM, Zinman B, Lakatta EG and Robbins J (2005) Transgenic rabbit model for human troponin I-based hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **111**:2330-2338.

Sanchez-Quintana D, Climent V, Garcia-Martinez V, Macias D and Hurlé JM (1994) Extracellular matrix arrangement in the papillary muscles of the adult rat heart. Alterations after doxorubicin administration and experimental hypertension. *Basic Res Cardiol* **89**:279-292.

Scully RE and Lipshultz SE (2007) Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. *Cardiovasc Toxicol* **7**:122-128.

Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R and Gersl V (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* **61**:154-171.

Swerdlow AJ, Higgins CD, Smith P, Cunningham D, Hancock BW, Horwich A, Hoskin PJ, Lister A, Radford JA, Rohatiner AZ and Linch DC (2007) Myocardial infarction mortality risk after treatment for Hodgkin disease: a collaborative British cohort study. *J Natl Cancer Inst* **99**:206-214.

Takemura G and Fujiwara H (2007) Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* **49**:330-352.

Thompson KL, Rosenzweig BA, Zhang J, Knapton AD, Honchel R, Lipshultz SE, Retief J, Sistare FD and Herman EH (2010) Early alterations in heart gene expression profiles associated with doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **66**:303-314.

Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T and Schlattner U (2006) New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol* **41**:389-405.

Van den Bosch BJ, Lindsey PJ, Van den Burg CM, Van der Vlies SA, Lips DJ, Van der Vusse GJ, Ayoubi TA, Doevendans PA and Smeets HJ (2006) Early and transient gene expression changes in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Genomics* **88**:480-488.

Vergely C, Maupoil V, Benderitter M and Rochette L (1998) Influence of the severity of myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl free radical release and on post-ischemic recovery during reperfusion. *Free Radic Biol Med* **24**:470-479.

Wang YX and Korth M (1995) Effects of doxorubicin on excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocardium. *Circ Res* **76**:645-653.

Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S and Irmak MK (2003) Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Res* **48**:377-382.

Footnotes

¹ This work was supported by grants from the Conseil Régional de Bourgogne, the Association de Cardiologie de Bourgogne and the Ligue Contre le Cancer.

Legends for Figures

Figure 1: Sirius red staining showing collagen deposition in the (A) perivascular (B) sub-epicardial regions of the left ventricular myocardium in untreated (C) and treated (DOX) (bright field microscopy: left panels and polarization microscopy: right panels). Magnifications are $\times 20$

Figure 2: Quantification of collagen deposition in the (A) perivascular (B) epicardial regions. C: control group, DOX: treated group. * $P < 0.05$. (number of rats; C: n=4; DOX: n=4)

Figure 3: mRNA levels of atrial natriuretic factor (ANF), myosin heavy chain β (β -MHC), vascular endothelial growth factor (VEGF α), sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} -ATPase (SERCA2a) and heme oxygenase-1 (HMOX) in untreated (C) and treated (DOX). The values are means \pm SEM (number of rats; C: n=8; DOX: n=8).

Figure 4: Correlation between ANF, β -MHC and SERCA2a expressions and $+dP/dT_{\text{max}}$ (mmHg/s) in untreated (C) and treated (DOX) rats (number of rats; C: n=8; DOX: n=8).

Table 1: Primers used for comparative quantitative polymerase chain reaction analysis

Symbols	Abbreviation	Genebank	Forward	Reverse
ANF	<i>Nppa</i>	NM_012612	CGTATACAGTGCGGTGTCCAAC	CCGAGAGCACCTTCTCTCTGAGA
VEGFa	<i>Vegfa</i>	NM_031836	TGGACCCTGGCTTTACTG	GGACGGCTTGAAGATATACTC
HMOX1	<i>Hmox1</i>	NM_012580	TGACAGAGGAACACAAAGACC	TGAGTGTGAGGACCCATCG
β-MHC	<i>Myh7</i>	NM_017240	TTGCTGTTATTGCTGCCATTG	CAAATCGGGAGGAGTTATCATTC
SERCA2a	<i>Atp2a</i>	NM_017290	TGTATCGACAGGACAGAAAGAG T	TGATGAGCGAGACAGATTCACCT G

Table 2: Body weight, heart weight and heart to body weight ratio in control group (C) and doxorubicin group (DOX), 2 months after the end of the treatment (***P < 0.001, **P < 0.01: DOX vs. C). The values are means \pm SEM of n (number of rats; C: n=8; DOX: n=8).

	Body weight (g)	Heart weight (g)	Heart to body weight ($\times 10^{-4}$)
C	494 \pm 9	1.00 \pm 0.02	20.4 \pm 0.5
DOX	378 \pm 13 **	0.87 \pm 0.04 **	23.0 \pm 0.3 ***

Table 3: Cardiac functional parameters evaluated *in vivo* by left ventricle catheterization in the control group (C) and the doxorubicin group (DOX), 2 months after the end of the treatment (** P < 0.01, * P < 0.05: DOX vs C). The values are means \pm SEM (number of rats; C: n=8; DOX: n=8).

	HR (beats/min)	LVDP (mmHg)	+dP/dT (mmHg/s)	-dP/dT (mmHg/s)
C	343 \pm 7	121 \pm 6	3807 \pm 230	3549 \pm 300
DOX	325 \pm 12	97 \pm 7 *	2827 \pm 259 **	2628 \pm 308

Table 4: Plasma and cardiac oxidative stress parameters evaluated 2 months after the end of the treatment in the control group (C) and the doxorubicin group (DOX) (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$: DOX vs. C). The values are means \pm SEM of n (number of rats; C: n=8; DOX: n=8).

	Plasma			Myocardium	
	TBARS (nmol/g prot.)	Ascorbate ($\mu\text{mol/L}$)	AFR/ascorbate (AU/ $\mu\text{mol/L}$)	TBARS ($\mu\text{mol/g tissue}$)	DHE (10^{-4}) (%fluo./nucl.)
C	22 \pm 1	42.4 \pm 3.5	51 \pm 4	13.9 \pm 1.4	4.61 \pm 1.10
DOX	28 \pm 1**	21.2 \pm 1.7***	76 \pm 6**	21.7 \pm 3.3*	9.14 \pm 1.81*

Fig 1

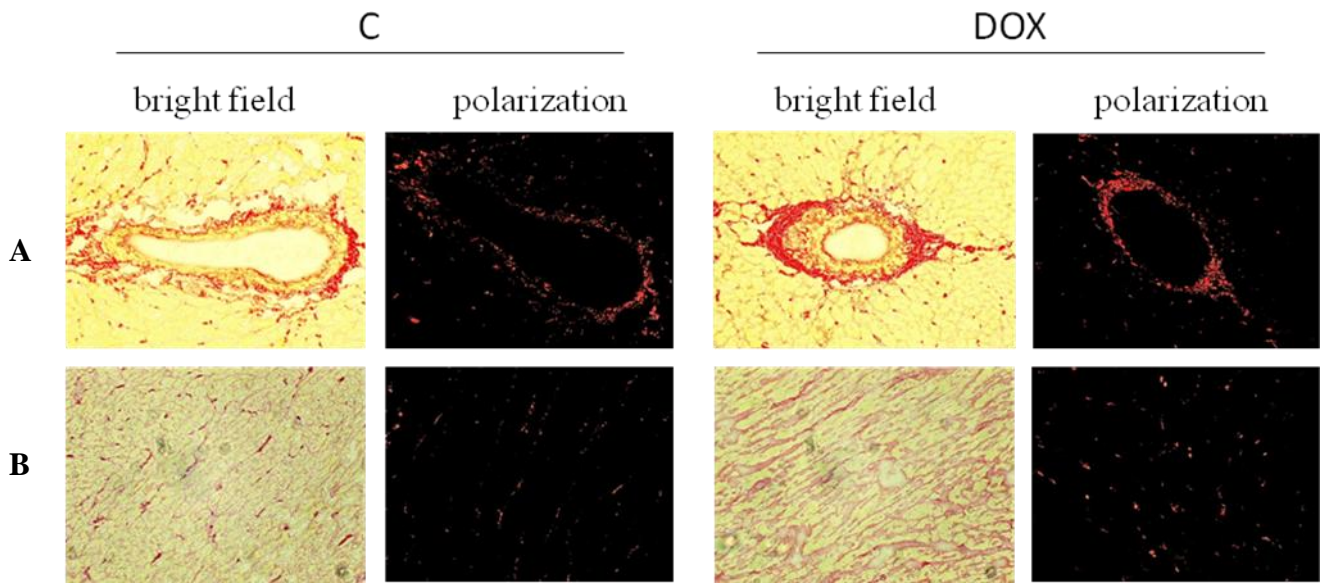


Fig 2

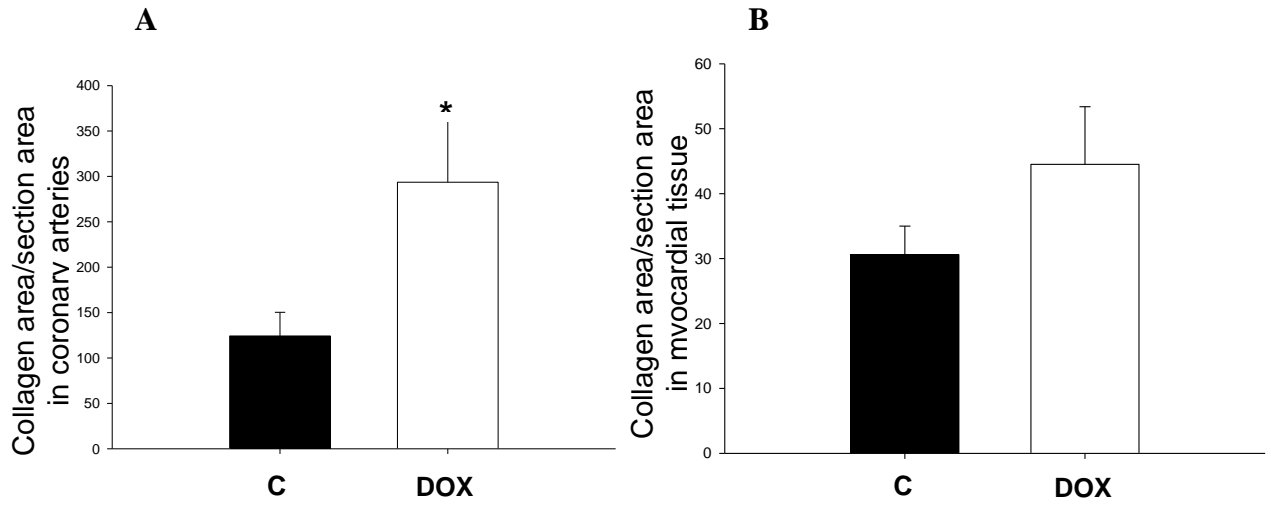


Fig 3

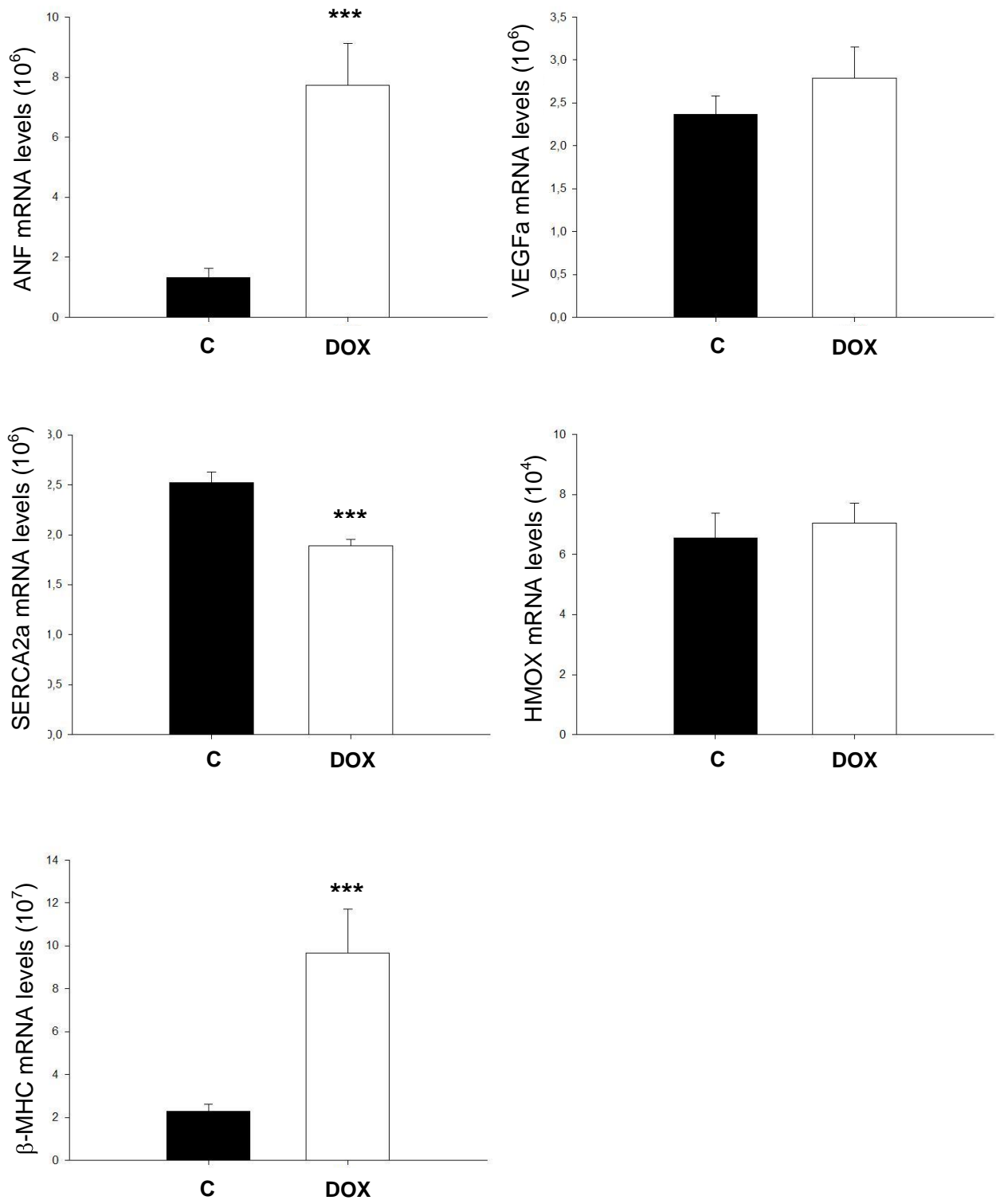
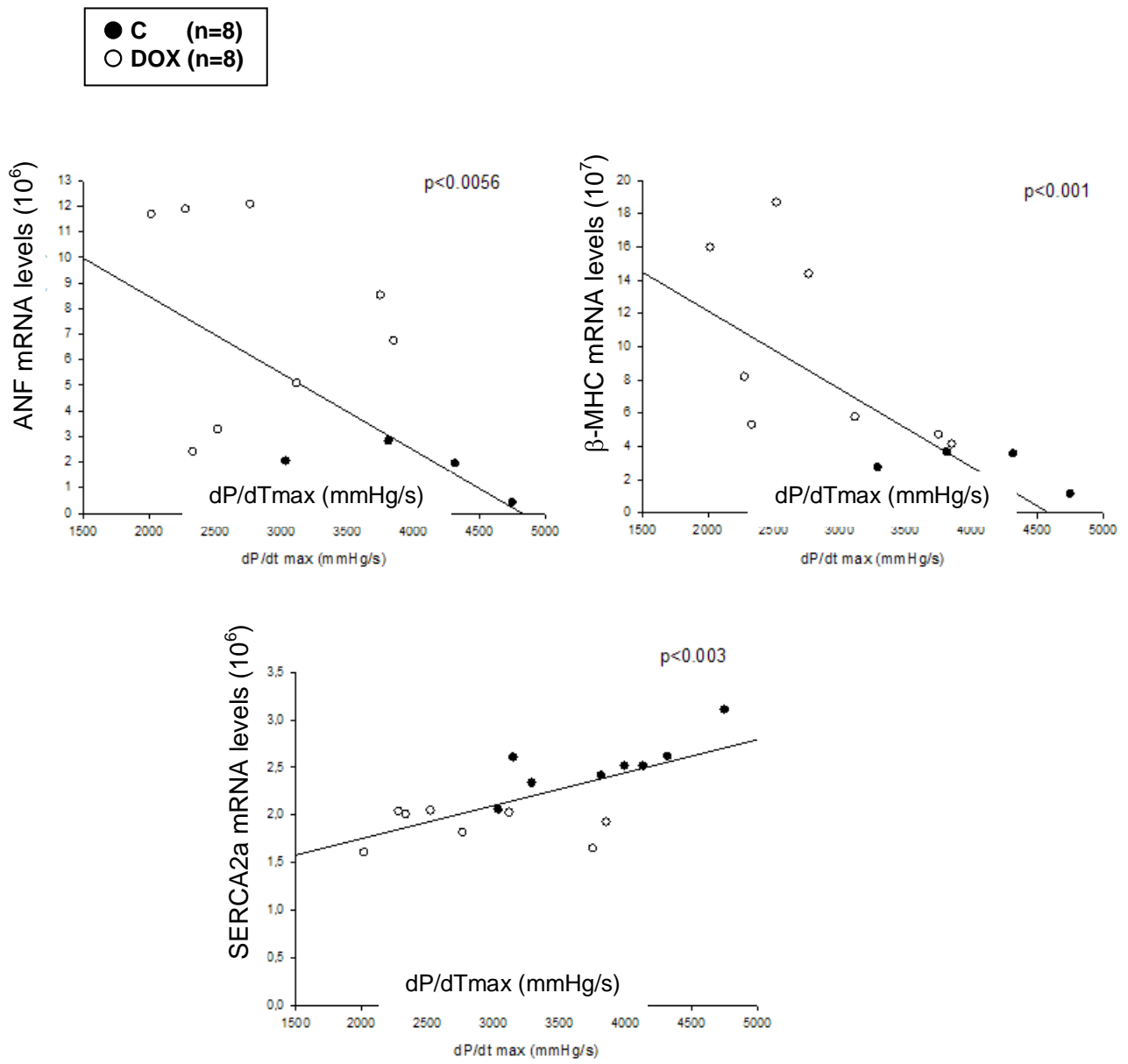


Fig 4



III.

APPROCHE CLINIQUE

III.1.- Characteristics and in-hospital outcomes of women with a history of breast cancer and acute myocardial infarction. Data from the RICO survey

Objectifs

Notre travail clinique porte sur l'étude d'une population de patientes ayant un antécédent de cancer du sein au cours de la phase aiguë d'un infarctus du myocarde en la comparant à une population de patientes du même âge mais sans antécédent de cancer du sein.

Les objectifs de cette étude sont multiples :

- comparer le profil cardiovasculaire de chacune de ces 2 populations.
- analyser et comparer le type, la localisation, l'étendue et le retentissement de l'infarctus dans les 2 groupes.
- apprécier les stratégies de reperfusion et les traitements mis en place à la phase aiguë chez ces patientes.
- étudier la survenue d'événements cardiovasculaires et l'évolution et à court terme de ces patientes.

Résultats

Aucune différence significative n'a été mise en évidence en ce qui concerne les facteurs de risque cardiovasculaire présentés par les patientes des 2 populations. La topographie ainsi que le type d'infarctus du myocarde (NSTEMI / STEMI) n'étaient pas différents en fonction de la population considérée. Le choix du mode de revascularisation tout comme les thérapeutiques introduites à la phase aiguë de l'infarctus ne semblent pas avoir été influencés par les antécédents de cancer du sein. Malgré une prise en charge thérapeutique identique dans le groupe des patientes avec un antécédent de cancer du sein, ces patientes développent plus de complications post-infarctus à court terme. La présence d'un antécédent de cancer du sein apparaît comme un facteur prédictif indépendant de survenue d'événements cardiovasculaires rythmiques: arythmie complète par fibrillation auriculaire, flutter auriculaire, tachycardie ventriculaire, fibrillation ventriculaire, bloc auriculo-ventriculaire (OR=1,88 [1,09-3,24], p=0,023) mais aussi non rythmiques: AVC, AIT, hémorragie majeure, récurrence d'infarctus, décès cardiovasculaire (OR=1,89 [1,11-3,19], p=0,018).

Characteristics and in-hospital outcomes of women with a history of breast cancer and acute myocardial infarction. Data from the RICO survey

Carole Richard^{1,2}, Stéliciana Ghibu², Patrick Arveux³, Bruno Coudert⁴, Luc Lorgis^{1,2}, Aurélie Gudjoncik^{1,2}, Claude Touzery¹, Catherine Vergely², Luc Rochette²,
Yves Cottin^{1,2}, Marianne Zeller²

¹Department of Cardiology, University Hospital, Dijon; ²Laboratory of Cardiovascular and Experimental Physiopathology and Pharmacology, IFR santé STIC, University of Burgundy, Dijon; ³Registre des Cancers du Sein et autres Cancers Gynécologiques de Côte d'Or, Georges-François Leclerc, Anticancer Centre ⁴Department of Oncology, Georges François Leclerc, Dijon, France.

Address for correspondence: Marianne Zeller, Laboratory of Experimental and Cardiovascular Physiopathology and Pharmacology, IFR santé-STIC, Faculty of Medicine, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France.
Email: marianne.zeller@u-bourgogne.fr
Phone: 33 38 029 3311 Fax: 33 38 029 3333

Word count:

Short title: Myocardial infarction and previous breast cancer.

STRUCTURED ABSTRACT

Background. In most developed countries, Breast Cancer (BC) is currently the most frequent cancer in women, and CV diseases such as myocardial infarction (MI) are the leading cause of death. We aimed to analyse the characteristics and outcomes of women with a history of BC in the setting of acute MI.

Patients and methods. Among the 2080 consecutive women included between 01/01/2001 and 31/12/2010 in the French regional RICO survey database, 104 (5%) had a history of BC. Each woman with prior BC (n=104) was matched, with respect to age, with 5 women without prior BC (n=520).

Results. Women with prior BC were 75 (65-80) year old. Median time from BC diagnosis to acute MI was 13 years. Most BC had been treated by surgery and/or radiation therapy, and 45% had also received hormone therapy. CV risk factors, including blood lipids, type of MI, as well as acute management and in-hospital complications were similar for the 2 groups. However, median admission CRP levels showed a trend toward a lower level in women with a history of BC (p=0.082). History of BC was associated with increased rate of in-hospital rhythmic events, combining atrial fibrillation/AV block/ventricular arrhythmias, and non-rhythmic events combining CV death, stroke, recurrent MI, and major bleeding events. By multivariate analysis, BC remains an independent predictor of worse outcomes, for both rhythmic and non-rhythmic events (OR (95%CI: 1.88(1.09-3.24) and 1.89(1.11-3.19), respectively).

Conclusions. In women admitted for acute MI, a non-negligible proportion had prior BC. Women with prior BC had a similar risk profile and presentation to those in women without prior BC. BC women were strikingly associated with worse in-hospital prognosis, including increased rate of arrhythmias.

INTRODUCTION

Over the last decade, Breast Cancer (BC) incidence has grown in developed countries to the most frequent cancer in women, by 0.2% per year between 1997 and 2000 [22]. Over this period, not only the incidence, but also the typical features of BC, including management and prognosis, has considerably evolved. Improvements in BC detection and therapy have resulted to significant survival gains, with BC-specific mortality decreasing by almost 24% between 1990 and 2000 [21]. As a result, it has been estimated that approximately 2.3 million American women are now living with a previous history of BC, with sufficient survival to be at risk for cardiovascular disease (CVD) [21]. In the U.S., more than a quarter of a million women die each year from CVD and current projections indicate that this will still increase with our aging population and epidemics of risk factors such as obesity, metabolic syndrome, and diabetes mellitus. Notably, CVD including acute myocardial infarction (MI) is the leading killer of women at all ages, with annual mortality rates affecting greater numbers of younger and older women than BC [4].

A growing population of women, resulting from increased BC survivors and population aging, are therefore expected to be exposed to MI risk. However, this emerging cohort of new CV women has only been weakly addressed in the setting of acute MI. In women who have suffered a BC, the additional occurrence of MI may aggravate the burden of the disease. CV effects of adjuvant therapies for BC such as anthracyclines or radiotherapy may also enhance susceptibility to further CV injury and, ultimately, altered prognosis. Moreover, the women with BC history present particular challenges that may directly or indirectly impact on the acute management of MI (24). Whether such women share the same prognosis remains to be investigated.

In a large population study of acute MI, from comprehensive data in a regional crossed study derived from 2 surveys of acute MI and BC, we aimed to determine the frequency, characteristics and outcomes of women with BC history and acute MI. .

MATERIALS AND METHODS

This study was based on the retrospective analysis from two regional registries: the Observatoire des Infarctus of Côte-d'Or (RICO), and the Registre des cancers du sein et des cancers gynécologiques de Côte d'Or both covering the same northern region of France. The design and methods of these 2 surveys have been described [13, 47].

This study included all of the women hospitalized for acute MI between 1st January 2001 and 31st December 2010. The definition of MI was based on European Society of Cardiology and the American College of Cardiology [1]. The data were prospectively collected for age, CV risk factors, as well as hemodynamic parameters, Killip class at admission and the infarct characteristics. We also reported chronic treatments taken by the patients before the acute event and those administered < 48 hours. Transthoracic echocardiography was performed at 2±1 days to measure left ventricular ejection fraction (LVEF) using the Simpson method. The GRACE risk score (Global Registry of Acute Coronary Events) was calculated to evaluate the risk of death (www.outcomes-org/grace/acs_risk.cfm) [20].

Blood samples were taken at admission. Plasma creatinine levels were measured on a Vitros 950 analyzer (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY). Cockcroft-Gault formula was used to estimate serum creatinine clearance. C-reactive protein was measured on Dimension Xpand (Dade Behring, Newark, NE) with an immunonephelometry assay. Plasma N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) was determined by ELISA with an Elecsys NT-proBNP sandwich immunoassay on Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Plasma troponin Ic levels were assessed by sampling every eight hours during the first two days after admission (Dimension Vista Intelligent Lab System, Siemens).

Outcomes

In-hospital adverse events —i.e. VAs (ventricular arrhythmias), stroke, recurrent MI, cardiogenic shock or death—were recorded. VAs were defined as either sustained ventricular tachycardia (VT) or ventricular fibrillation (VF). VT was defined as a regular wide complex tachycardia of ventricular origin lasting >30 sec or requiring termination due to hemodynamic instability. VF was defined as irregular undulations of varying shape and amplitude on ECG without discrete QRS or T waves that resulted in prompt hemodynamic compromise requiring direct-current cardioversion. Heart failure was defined as a Killip class >1. Recurrent MI was diagnosed by ECG modifications and increased serum troponin. Atrial fibrillation definition is

based on irregular fibrillatory waves at 350 to 600 pulses/min in the atrium with irregular QRS complexes on ECG [12]. Atrioventricular block (AV block) refers to the delay or the interruption of electrical impulses from the atria to the ventricles due to an abnormality in the conduction system [46]. Major bleeding is defined by life-threatening bleeding with at least 1 of the following: bleed requiring transfusion of ≥ 2 units of packed red blood cells, or resulting in an absolute reduction in hematocrit of $\geq 10\%$, intracranial/subdural bleeding, or bleeding that resulted in death [27].

After hospital discharge, 30-day information on cardiovascular death was acquired by contacting each patient individually, their relatives, or treating physician and by reviewing the hospital records if the patient had been re-hospitalized.

In order to limit the potential imbalances between women with BC vs. without BC, each BC woman was matched with 5 women without BC history (BC free). The matching procedure was based on age and year of inclusion.

In order to ensure the comprehensive analysis of the BC case, the data from the RICO survey were crossed with the Registre des Cancers du Sein et des cancers Gynécologiques de Côte d'Or which started in 1982. From each database, we extracted data on all common patients who were recorded as having been treated in the region of Côte d'Or for BC prior to the acute MI. For each common patient, BC location, characteristics, extension, surgical or pharmacological strategies were registered.

The present study complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of University Hospital of Dijon. Each patient gave written consent before participation.

STATISTICS

Data are presented as median (25th to 75th percentile) or number (percentage). For continuous variables, we used the Kolmogorov-Smirnov analysis to check the normality of the distribution. Data were compared using either Student's t test or Mann and Whitney, as appropriate. Dichotomous variables, expressed as numbers and percents, were compared by the χ^2 test.

Multivariate logistic regression analysis was used to identify independent predictors of in-hospital events, by building models for 1) combined rhythmic events (AF/AV block/VF/VT) and 2) combined non-rhythmic events (stroke/major bleeding/recurrent MI, CV death). Variables were included in the multivariate models if associated with the outcomes by univariate analysis ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed with SPSS software 12.0 (SPSS, Inc, Chicago, Ill).

RESULTS

Among the 2080 women included in the RICO database for an acute MI during the inclusion period, 104 (5%) had a history of BC. Data on BC treatment regimen and characteristics were available for most women, i.e. 84(81%) (Table 1). Almost half were left sided BC and most undergone surgery by lumpectomy or mastectomy and radiotherapy. Less than 1/3 had chemotherapy of whom 11(15%) women had anthracycline therapy, including doxorubicin and epirubicin. However, they often had hormone therapy (45%) after BC including tamoxifene and aromatase inhibitors. The median time from BC diagnosis to acute MI was long (13 y).

Each of the 104 MI women with prior BC has been matched on age with 5 MI women without BC (i.e. BC-free control) (n=520) from the database. Table 2 shows the characteristics of the study population. No difference was found between the women with or without a history of BC for risk profile, including dyslipidemia, hypertension and BMI, or chronic treatments. On admission hemodynamic, biological and clinical parameters, including GRACE risk score, LVEF and type of MI was similar for the 2 groups. On coronary angiography, the pattern of coronary vessel disease was the same for both groups. Acute treatments or revascularization strategy (i.e. thrombolysis or PCI) was also similar for the 2 groups. Only CRP levels on admission were slightly lower in BC women (p=0.03). In BC women group, 3 of them had an history of another cancer (2.9%) whereas 13 patients without BC had developed another type of neoplasia (2.5%).

In contrast, women with a history of BC had worse in-hospital outcomes than their BC-free control. More precisely, prior BC was characterized by marked increased rate of rhythmic events (+45%, from 21.2% to 31.8%) combining VT/VF, AF and AV block (Figure 1). Strikingly, AF showed a trend toward a 60% increased occurrence in BC group (p=0.08). Non-rhythmic complications combining stroke/TIA, recurrent MI, major bleeding and CV death, were also more frequent in BC women, from 20.6% to 33.7% (Figure 2). In particular, the rate of stroke was 40% increased in BC women when compared with their BC-free counterpart (p=0.008). The rate of pericardial effusion, which was very low, was similar in BC women vs BC-free (1(1%) vs 8(2%), p=1.00). Moreover, we found no difference in cardiogenic shock (13(13%) vs 62 (12%), p=0.88)

By univariate analysis, age, altered LVEF, prior BC and acute treatments were associated with the outcomes (rhythmic or non rhythmic events). By multivariate analysis, BC women had a roughly 90% higher likelihood of developing major complications in-hospital compared

with women prior BC, for both rhythmic and non-rhythmic events (OR (95%CI: 1.88(1.09-3.24) and 1.89(1.11-3.19), respectively), and even when adjusted for confounding including age, LVEF, and acute treatments (Tables 3 and 4). The quality index of the 2 models were satisfactory (for rhythmic events: -2LL: 482; Hosmer-Lemeshow: p=0.814; Rate of correctly classified=77%); for non-rhythmic events: -2LL: 519; Hosmer-Lemeshow: p=0.163; Rate of corrected classified=79%).

DISCUSSION

More women survive their BC with substantial improved screening and management of such malignancy, leading, along with population aging, to growing number of BC women at risk for MI. Furthermore, current BC therapies (i.e. polychemotherapy, radiotherapy, and hormone therapies) have several delayed adverse CV effects that may affect the prognosis of women suffering an acute MI [24]. Therefore, further closure of knowledge gaps related to pathophysiology, characteristics, management and outcomes of acute MI in women with past BC is a major clinical challenge. From a retrospective analysis on comprehensive crossed data from regional registry, this is the first study to specifically analyze the frequency, characteristics, treatments and outcomes in women with a history of BC. We found that in spite of similar risk profile and left ventricular function, clinical outcome in BC women may be worsened by the pre-existent co-morbidity. Furthermore, our work strongly suggest that women with BC were more prone to develop rhythmic events, including atrial fibrillation, and stroke at the acute phase of an acute MI.

Frequency, and baseline characteristics

The frequency and characteristics of BC history in women with acute MI has only been poorly investigated. Our works suggest that a non-negligible number of women (5%) are currently admitted for an acute MI with a history of BC. In our study, BC diagnosis was quite old, as most BC (75%) was diagnosed > 6 year before the acute event. Therefore, we presume that, at MI onset, most BC women are no more under cancer therapies, including adjuvant endocrine intervention. Our study population is characterized by older mean age (75y) and high risk profile. Our work indicate that the rate of risk factors of women with previous BC was very similar to BC-free control women, including hypertension, blood lipids and prior CV history. These findings are in agreement with a large retrospective analysis showing that patients admitted for a stroke with a additional diagnosis of cancer had CV risk factors similar to non-cancer patients and general population [18, 39]. Also the coronary lesions showed no difference on angiographic characteristics, further suggesting the absence of marked effects of

cancer history and/or treatments on atherome plaque burden. Moreover, we had no impact of cancer history on early characteristics of acute MI, including type of MI, hemodynamic and biological data on admission. Only the level of CRP on admission was slightly lower in BC group. CRP blood levels measured in the early hours after MI onset, reflect both low-grade atherosclerosis-related inflammation and infarction-induced inflammatory reaction. Whether these reduced CRP levels are linked to BC-related long-term treatment or other unmeasured confounding such as healthier life style in BC women remains to be investigated. Moreover, given that CRP level is a prognostic factor of mortality after BC, we cannot exclude a survivor effect i.e. only BC women with low CRP have survived.

Left ventricular function and heart failure

Several chemotherapeutic agents used in BC, such as anthracycline or trastuzumab, may acutely or chronically interfere with LV function [31, 45]. Epidemiologic evidence suggests that, even in the absence of an overt decline in LVEF, doxorubicin or epirubicin-based adjuvant chemotherapy carries a risk of developing heart failure at long term after completing chemotherapy, especially in women >65y [15]. Moreover, HER-2 directed therapies, i.e. trastuzumab, are associated with short term cardiac toxicity, in particular for heart failure, but long-term cardiac effects of these trastuzumab-based strategies remain unknown. In BC women, the long-term current CV effects of radiotherapy are controversial, from the lack of major impact [35] to limited cardiopulmonary damage [29], but anyway doesn't involve LV dysfunction. Interestingly, our findings provide important information in such older women and suggest that chemotherapy and radiotherapy received several years ago may not significantly aggravate LV function or risk of developing HF in women at the acute phase of MI.

Rhythmic events

It is noteworthy that we found an almost 50% greater incidence of supraventricular rhythm disorders in BC women when compared with BC-free control. Ventricular hyperexcitability occurred along with atrial rhythm disorders. Ventricular or supraventricular rhythm disturbances onset originates from 2 major competing causes including anatomical substrate, and autonomous nervous system regulation [28]. Although BC-related disease process per se is unlikely to directly impact on rhythm disorder, some anti-cancers therapies such as radiation may negatively influence such phenomena. In our study, most (90%) BC women underwent radiotherapy, of whom half were left sided. Older radiotherapy techniques for BC, i.e. until the mid 1980s, were associated with long-term CV mortality, and this risk was even increased in left-sided BC when compared with right-sided BC [7]. Although refinements in

modern radiotherapy techniques have allowed reduction in CV effects in most BC, a slight but meaningful increase in CV risk persist in patients irradiated for cancer of the left breast [36]. Radiation-induced heart disease consists of a group of various pathological conditions resulting from injury to the heart caused by irradiation of adjacent tissues, including restrictive cardiomyopathy and tissue fibrosis. Non-specific diffuse interstitial fibrosis may alter the compliance of the myocardium and affect cells involved with conduction, leading to arrhythmias. [8, 14, 26, 41]. Moreover, experimental works have suggested that heart rate modulation by the autonomous nervous system is impaired by neurotoxic chemotherapy drugs, including anthracyclines [21, 23]. However, whether such impairment is involved in the increased rate of arrhythmias remains speculative.

AF is a common complication of acute MI that is associated with worsen prognosis. Recent data suggest that cancer are unrecognized risk for atrial fibrillation/flutter, probably enhanced by early surgery [17, 25, 43]. Our data is in agreement with such findings, further suggesting that prior BC is also a condition that enhances myocardial susceptibility to acute ischemia/necrosis.

Only small or short-term studies have reported the effects of BC-related treatments on the developpement of cardiac conduction abnormalities (i.e. AV block), in particular in the peri-operative context [2, 42, 44]. With anterior wall infarction, which is the most frequent localization of infarction, AV conduction disorders most often result from tissue necrosis reaching conduction pathways and reflect extensive myocardial infarction [3]. Given that we found similar extent of infarction for the 2 groups, as assessed by peak troponin Ic, the trend toward an increased rate of AV in the BC group is unlikely to be explained by difference in infarct size. Contributing factors of AV disturbance also include sympathetic system modulation through vagal hypertonia, inflammation and oedema of the conduction pathways [3]. In our study, circulating levels of inflammation, as assessed by plasma CRP, showed a trend toward a lower level in the BC group. Therefore, the higher incidence of conduction disturbances in BC women may not stem from an inflammatory state. However, further cohort studies including sensitive imaging modalities (i.e. SPECT, CMR, exercise or dobutamine stress testing) are needed to investigate the long-term effects of current BC therapies on myocardial damage.

Non-rhythmic events

One of our major finding is that the short-term prognosis of women with acute MI is markedly worsened when they had prior BC, including CV mortality. Prognosis may be worsened through increased rate of rhythm disturbance, that are known predictors of the

outcomes in acute MI. An increased incidence of supraventricular rhythm disorders may contribute to the greater incidence of in-hospital recurrent MI and atrial fibrillation/flutter may induce myocardial ischemia, leading to type-2 infarction [30]. Alternatively, BC-related treatment may also exert long-lasting detrimental effects on the CV system that affects the prognosis at the acute phase of MI. Lymph nodes radiation, along with carotid arteries, have been shown to be associated with increased risk of stroke [32, 33, 37]. An increased risk of mortality has also been found in patients who underwent coronary stent implantation 6 y after previous thoracic radiotherapy for lymphoma, lung or breast cancer (HR (95%CI: 4.2:1.0-17.0) [16]. Given the detrimental interaction between DES and irradiation in animal studies [9], these data need to be verified in larger patient's population. The trend toward an increased rate of recurrent MI can also be linked to coagulation disorders and enhanced platelet activation, associated with breast carcinoma [10]. Although BC women had the same rate of anti-platelet and anti-thrombin strategies as acute treatments, we found a trend toward an increased rate of in-hospital bleeding events. Coagulation disorder and thromboembolic events are common in patients with on-going cancer [6, 11], make patient management more complicated, and are associated with increased mortality [38, 40]. Moreover, cancer chemotherapy has been shown to both amplify the prothrombotic effect of cancer cells and to damage vessel walls directly, and is increasingly recognized as a risk factor for thromboembolic complications [5, 19, 34].

STUDY LIMITATIONS

The major limitation of our work is the lack of accurate information concerning radiotherapy and chemotherapy protocols, treatment chronology and modalities used. Furthermore, few patients or even none have benefited from new treatment strategy such as targeted therapy. However, this study is based on registries which refer to the real life across a region. Despite these limitations and the small sample of the population studied, our data are strong enough to suggest the prognostic value of BC history in myocardial infarction outcomes. Nonetheless, they must be confirmed by further prospective studies in a larger population.

CONCLUSION

Due to advances in diagnosis and treatment, BC is becoming an increasingly survivable disease with a large population of long-term survivors and hence exposed to MI risk. The

focus has therefore shifted to management of women with both co-morbidities. Our work strongly suggests that women diagnosed several years ago with BC are at higher risk after acute MI, in spite of similar presentation and risk factors. BC-related treatments induced a series of sequential or concurrent CV injury that converge to enhance susceptibility to further CV insult, in particular for rhythm disturbance, and ultimately worse acute prognosis. Further large prospective studies are urgently needed to specifically address the long-term CV complications of women with past history of breast carcinoma including current adjuvant therapies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Anne Cécile Lagrost, Florence Bichat and Juliane Berchoud for research assistance and Philip Bastable for English assistance.

FUNDING

This work was supported by the University Hospital of Dijon, Association de Cardiologie de Bourgogne, Conseil Régional de Bourgogne, Fédération Française de Cardiologie, and by grants from the Union Régionale des Caisses d'Assurance Maladie (URCAM), the Agence Régionale d'Hospitalisation (ARH) and the Agence Régionale de santé de Bourgogne (ARS).

1. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP (2000) Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 36:959-969
2. Ando M, Yokozawa T, Sawada J, Takaue Y, Togitani K, Kawahigashi N, Narabayashi M, Takeyama K, Tanosaki R, Mineishi S, Kobayashi Y, Watanabe T, Adachi I, Tobinai K (2000) Cardiac conduction abnormalities in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25:185-189
3. Aplin M, Engstrom T, Vejlstrup NG, Clemmensen P, Torp-Pedersen C, Kober L (2003) Prognostic importance of complete atrioventricular block complicating acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 92:853-856
4. Bairey Merz CN Women and ischemic heart disease paradox and pathophysiology. *JACC Cardiovasc Imaging* 4:74-77
5. Bick RL (2003) Cancer-associated thrombosis. *N Engl J Med* 349:109-111
6. Blom JW, Vanderschoot JP, Oostindier MJ, Osanto S, van der Meer FJ, Rosendaal FR (2006) Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *J Thromb Haemost* 4:529-535
7. Bouillon K, Haddy N, Delaloge S, Garbay JR, Garsi JP, Brindel P, Mousannif A, Le MG, Labbe M, Arriagada R, Jouglu E, Chavaudra J, Diallo I, Rubino C, de Vathaire F Long-term cardiovascular mortality after radiotherapy for breast cancer. *J Am Coll Cardiol* 57:445-452
8. Brusca A, Orzan F, Figliomeni MC (1993) [Cardiopathy due to therapeutic irradiation of the thorax. The diagnostic criteria]. *Cardiologia* 38:163-172
9. Busseuil D, Collin B, Rioufol G, Korandji C, Zeller M, Maingon P, Briot F, Cottin Y, Rochette L (2009) Combining sirolimus-eluting stents and external irradiation in cholesterol-fed rabbits increased incomplete stent apposition and decreased re-endothelialization. *J Cardiovasc Pharmacol* 53:318-324
10. Caine GJ, Lip GY, Stonelake PS, Ryan P, Blann AD (2004) Platelet activation, coagulation and angiogenesis in breast and prostate carcinoma. *Thromb Haemost* 92:185-190
11. Chew HK, Wun T, Harvey D, Zhou H, White RH (2006) Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Arch Intern Med* 166:458-464
12. Crandall MA, Bradley DJ, Packer DL, Asirvatham SJ (2009) Contemporary management of atrial fibrillation: update on anticoagulation and invasive management strategies. *Mayo Clin Proc* 84:643-662
13. Dabakuyo TS, Bonnetain F, Roignot P, Poillot ML, Chaplain G, Altwegg T, Hedelin G, Arveux P (2008) Population-based study of breast cancer survival in Cote d'Or (France): prognostic factors and relative survival. *Ann Oncol* 19:276-283
14. Dogan I, Sezen O, Sonmez B, Zengin AY, Yenilmez E, Yulug E, Abidin I, Bahat Z (2010) Myocardial perfusion alterations observed months after radiotherapy are related to the cellular damage. *Nuklearmedizin* 49:209-215
15. Doyle JJ, Neugut AI, Jacobson JS, Grann VR, Hershman DL (2005) Chemotherapy and cardiotoxicity in older breast cancer patients: a population-based study. *J Clin Oncol* 23:8597-8605
16. Dubois CL, Pappas C, Belmans A, Erven K, Adriaenssens T, Sinnaeve P, Coosemans M, Kayaert P, Weltens C, Desmet W Clinical outcome of coronary stenting after thoracic radiotherapy: a case-control study. *Heart* 96:678-682

17. Erichsen R, Christiansen CF, Mehnert F, Weiss NS, Baron JA, Sorensen HT Colorectal cancer and risk of atrial fibrillation and flutter: a population-based case-control study. *Intern Emerg Med*
18. Ewer MS, Gluck S (2009) A woman's heart: the impact of adjuvant endocrine therapy on cardiovascular health. *Cancer* 115:1813-1826
19. Falanga A (2009) The incidence and risk of venous thromboembolism associated with cancer and nonsurgical cancer treatment. *Cancer Invest* 27:105-115
20. Fox KA, Dabbous OH, Goldberg RJ, Pieper KS, Eagle KA, Van de Werf F, Avezum A, Goodman SG, Flather MD, Anderson FA, Jr., Granger CB (2006) Prediction of risk of death and myocardial infarction in the six months after presentation with acute coronary syndrome: prospective multinational observational study (GRACE). *BMJ* 333:1091
21. Gorodetskaya EA, Dugin SF, Golikov MA, Kapelko VI, Medvedev OS (1990) The cardiac contractile function and hemodynamic control in rats after chronic adriamycin treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 68:211-215
22. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ (2006) Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56:106-130
23. Jeon TJ, Lee JD, Ha JW, Yang WI, Cho SH (2000) Evaluation of cardiac adrenergic neuronal damage in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy using iodine-131 MIBG autoradiography and PGP 9.5 immunohistochemistry. *Eur J Nucl Med* 27:686-693
24. Jones LW, Haykowsky MJ, Swartz JJ, Douglas PS, Mackey JR (2007) Early breast cancer therapy and cardiovascular injury. *J Am Coll Cardiol* 50:1435-1441
25. Koracevic GP Cancer is an Insufficiently Recognized Risk Factor for Atrial Fibrillation. *J Emerg Med*
26. Leenhardt A, Maison-Blanche P, Denjoy I, Cauchemez B, Joubert JP, Coumel P (1999) [Mechanism of spontaneous occurrence of tachycardia]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 92 Spec No 1:17-22
27. Lopez-Sendon J, Dabbous OH, Lopez de Sa E, Stiles M, Gore JM, Brieger D, van de Werf F, Budaj A, Gurfinkel EP, Fox KA (2009) In-hospital outcomes associated with fibrinolytic and thienopyridine use in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. The global registry of acute coronary events. *Rev Esp Cardiol* 62:501-509
28. Lorincz I, Szabo Z, Simko J, Szantho E, Barta K, Fuzi M, Szigeti G (2008) [Atrial fibrillation and the autonomous nervous system]. *Orv Hetil* 149:2019-2028
29. Marks LB, Yu X, Prosnitz RG, Zhou SM, Hardenbergh PH, Blazing M, Hollis D, Lind P, Tisch A, Wong TZ, Borges-Neto S (2005) The incidence and functional consequences of RT-associated cardiac perfusion defects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63:214-223
30. Meshkat N, Austin E, Moineddin R, Hatamabadi H, Hassani B, Abdalvand A, Marcuzzi A (2011) Troponin utilization in patients presenting with atrial fibrillation/flutter to the emergency department: retrospective chart review. *Int J Emerg Med* 4:25
31. Monsuez JJ, Charniot JC, Vignat N, Artigou JY Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *Int J Cardiol* 144:3-15
32. Nilsson G, Holmberg L, Garmo H, Terent A, Blomqvist C (2005) Increased incidence of stroke in women with breast cancer. *Eur J Cancer* 41:423-429
33. Nilsson G, Holmberg L, Garmo H, Terent A, Blomqvist C (2009) Radiation to supraclavicular and internal mammary lymph nodes in breast cancer increases the risk of stroke. *Br J Cancer* 100:811-816

34. Otten HM, Mathijssen J, ten Cate H, Soesan M, Inghels M, Richel DJ, Prins MH (2004) Symptomatic venous thromboembolism in cancer patients treated with chemotherapy: an underestimated phenomenon. *Arch Intern Med* 164:190-194
35. Patt DA, Goodwin JS, Kuo YF, Freeman JL, Zhang DD, Buchholz TA, Hortobagyi GN, Giordano SH (2005) Cardiac morbidity of adjuvant radiotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 23:7475-7482
36. Senkus-Konefka E, Jassem J (2007) Cardiovascular effects of breast cancer radiotherapy. *Cancer Treat Rev* 33:578-593
37. Silva J, Oliveira H, Camacho M, Pais JR, Leitao-Marques A (2011) Carotid stenting for radiation-induced carotid artery stenosis: a challenge? *Rev Port Cardiol* 30:73-80
38. Sorensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA (2000) Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med* 343:1846-1850
39. Stefan O, Vera N, Otto B, Heinz L, Wolfgang G (2009) Stroke in cancer patients: a risk factor analysis. *J Neurooncol* 94:221-226
40. Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Sanchez J, Olson RE (2006) Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. *Am J Med* 119:60-68
41. Stewart FA, Hoving S, Russell NS (2010) Vascular damage as an underlying mechanism of cardiac and cerebral toxicity in irradiated cancer patients. *Radiat Res* 174:865-869
42. Tzivoni D, Ratzkowski E, Biran S, Brook JG, Stern S (1977) Complete heart block following therapeutic irradiation of the left side of the chest. *Chest* 71:231-234
43. Velagapudi P, Turagam MK, Kocheril AG Atrial fibrillation in cancer patients: an underrecognized condition. *South Med J* 104:667-668
44. Wheeler DW, Liew TV, Bailey AR (2007) Peri-operative atrioventricular block as a result of chemotherapy with epirubicin and paclitaxel. *Anaesthesia* 62:186-189
45. Yeh ET (2006) Cardiotoxicity induced by chemotherapy and antibody therapy. *Annu Rev Med* 57:485-498
46. Yeo TJ, Teo SG, Soo WM, Poh KK Variations of atrioventricular block. *Singapore Med J* 52:330-334; quiz 335
47. Zeller M, Steg PG, Ravisy J, Lorgis L, Laurent Y, Sicard P, Janin-Manificat L, Beer JC, Makki H, Lagrost AC, Rochette L, Cottin Y (2008) Relation between body mass index, waist circumference, and death after acute myocardial infarction. *Circulation* 118:482-490

Figure 1: In-hospital rhythmic events and corresponding combined events.

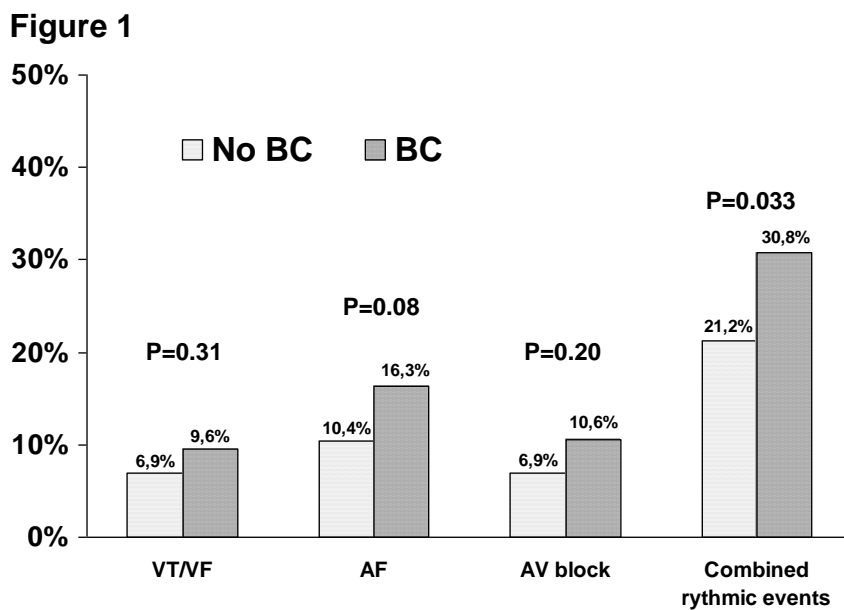


Figure 2: In-hospital non-rhythmic events and corresponding combined events

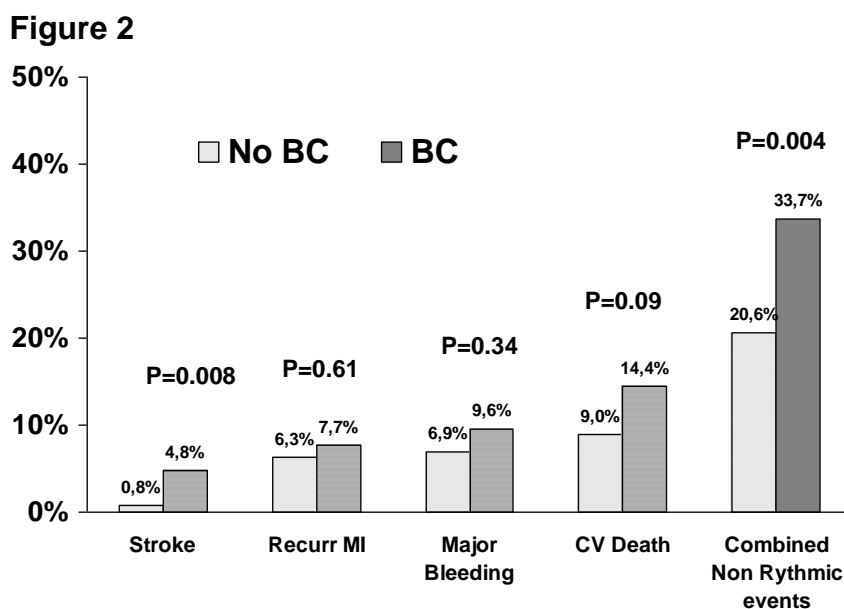


Table 1: Characteristics and management of BC in women with acute MI.

Left-sided breast cancer	43%
Macroscopic tumor, mm	15 (10-25)
Lymph-node involvement	33%
Lumpectomy	63%
Mastectomy	38%
Radiotherapy	89%
Chemotherapy	29%
Anthracycline chemotherapy	15%
Hormone therapy	45%
Time from BC to MI, y	13 (6-20)

Table 2: Baseline characteristics, and treatments. CV history: Cardiovascular history, CAD: Coronary Artery Disease, STEMI: ST Elevation Myocardial Infarction, LVEF: Left Ventricular ejection Fraction, ACE inhibitor: Angiotensin Converting Enzyme inhibitor, UFH/LMWH: Unfraction Heparin /Low Molecular Weight Heparin, PCI: Percutaneous Coronary Intervention.

	No Breast Cancer N=520	Breast Cancer n=104	p
Cardiovascular risk factors			
Age, y	75 (67-80)	75 (67-80)	1.00
Hypertension	352 (68)	64 (62)	0.28
Diabetes	137 (27)	29 (28)	0.81
Body mass index, kg/m ²	26 (23-30)	25 (22-29)	0.16
Hypercholesterolemia	238 (46)	39 (38)	0.19
Family history of CAD	151 (29)	34 (33)	0.37
Smoking	49 (9)	8 (8)	0.71
CV history			
Heart failure	19 (4)	2 (2)	0.37
CAD	93 (18)	13 (12)	0.18
Chronic treatments			
Aspirin	100 (19)	19 (18)	0.82
Statin	111 (21)	20 (19)	0.63
Beta-blocker	155 (30)	32 (31)	0.84
Admission			
Heart Rate, bpm	80 (70-97)	82 (69-95)	0.85
Systolic Arterial Pressure, mmHg	140 (120-160)	138 (120-151)	0.29
Diastolic Arterial Pressure, mmHg	80 (68-90)	77 (67-87)	0.32
Heart Failure	128 (25)	29 (28)	0.54
STEMI	303 (58)	62 (60)	0.80
Anterior wall location	203 (39)	35 (34)	0.30
LVEF<40 %	83 (19)	17 (19)	0.99
Time to admission	220 (120-533)	210 (112-450)	0.50
GRACE score	157 (135-182)	160 (137-184)	0.73
Coronary angiography			
	n=455	n=91	
Multivessel disease	215 (47)	9 (43)	0.44
No significant stenosis	37 (8)	3 (3)	0.12
Biological data			
Creatinine clearance, ml/min	53.10 (37.30-69.50)	51.60 (38.90-70.95)	0.93
Glucose, mmol/L	7.55 (6.11-10.11)	8.00 (6.65-9.87)	0.29
C-reactive protein > 3mg/l	286 (77)	47 (64)	0.03
Total cholesterol, g/L	1.98 (1.64-2.29)	1.98 (1.67-2.29)	0.79
LDL cholesterol, g/L	1.24 (0.92-1.48)	1.27 (0.99-1.57)	0.37
HDL cholesterol, g/L	0.47 (0.37-0.58)	0.47 (0.39-0.59)	0.72
Triglycerides, g/L	1.14 (0.86-1.57)	1.00 (0.71-1.42)	0.08
Peak troponin, µg/l	11.98 (2.29-40)	9.34 (3.24-29.95)	0.41
NT-proBNP , pg/ml	1865 (617-6149)	1561 (417-4045)	0.38
Treatments<48h			
Aspirin	471 (91)	96 (92)	0.58
Clopidogrel	401 (77)	78 (75)	0.64
Beta-blocker	372 (72)	78 (75)	0.47

ACE Inhibitor	280 (54)	51 (49)	0.37
Statin	333 (64)	63 (61)	0.50
Amiodarone	50 (10)	13 (12)	0.37
GPIIb/IIIa inhibitor	182 (35)	32 (31)	0.41
UFH/LMWH	474 (91)	95 (91)	1.00
Thrombolysis	25 (5)	5 (5)	0.63
PCI	287 (55)	58 (56)	0.82

IV.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

Nous nous proposons dans cette conclusion générale de souligner les points essentiels des différents travaux présentés dans ce mémoire de thèse et d'envisager des perspectives de recherche.

1/ Le déséquilibre de la balance oxydants / antioxydants, plasmatique et tissulaire, est retrouvé lors de nos évaluations à court terme et à long terme après l'administration d'Anthracyclines. Le stress oxydant est impliqué précocement dans la cardiotoxicité des Anthracyclines et est « auto entretenu » par des réactions en chaînes jusqu'à l'apparition des manifestations cliniques caractéristiques de l'atteinte myocardique.

2/ Le traitement préventif par IEC limite l'augmentation du niveau de stress oxydant circulant qui apparaît précocement après l'administration d'Anthracyclines mais ne prévient pas l'amorce du remodelage ventriculaire. L'initiation de cette cardiopathie dilatée apparaît sous la dépendance de mécanismes multifactoriels qui interviennent de manière synergique mais qu'il est difficile d'appréhender de manière spécifique sur le plan spatial et temporel.

3/ L'administration préventive et concomitante d'un antioxydant tel que l'acide alpha lipoïque n'est pas suffisante pour contrôler l'ampleur de l'induction radicalaire induite par les Anthracyclines et prévenir le développement d'une cardiomyopathie qui s'installe à long terme.

4/ L'installation et la chronicisation de cette cardiopathie est à composantes multiples. Hormis le stress oxydant, des modifications de l'expression de certains gènes interviennent. Ces gènes codent pour des protéines qui sont impliquées dans le métabolisme énergétique des cellules myocardiques et leur fonctionnalité.

5 / La présence d'un antécédent de cancer du sein apparaît comme un facteur prédictif indépendant de survenue, à court terme, d'événements cardiovasculaires rythmiques et non rythmiques en post-infarctus du myocarde.

Dans toute approche pharmacologique, la mise en place et la validation d'un modèle expérimental sont des étapes essentielles. Dans ce cadre, le développement d'un modèle animal de cardiomyopathie toxique aux Anthracyclines a été abordé. Notre premier travail a permis d'obtenir, chez le rat, une dysfonction myocardique débutante avec une dilatation du diamètre télédiastolique du ventricule gauche sans altération de la fonction pompe du cœur. Au cours des travaux suivants, le schéma d'administration utilisé pour la Doxorubicine et

l'évaluation plus à distance du traitement ont permis d'obtenir une véritable altération de la fonction contractile cardiaque mais au prix d'une mortalité importante. D'autres paramètres échocardiographiques, en dehors de la dysfonction systolique, sont en cours d'évaluation afin de réaliser un diagnostic plus précoce et ainsi une prise en charge plus rapide de cette cardiomyopathie. Le point commun de ces études est l'implication du stress oxydant dans l'installation de cette cardiomyopathie. On observe initialement un déséquilibre plasmatique entre espèces oxydantes et antioxydantes puis une surproduction d'espèces radicalaires au sein même du myocarde et de manière concomitante une altération des paramètres fonctionnels cardiaques. En accord avec plusieurs résultats rapportés dans la littérature, l'administration de molécules antioxydantes tel que l'acide alpha lipoïque n'est pas suffisante pour prévenir le développement de cette cardiotoxicité. L'ampleur du stress oxydant généré mais surtout la multiplicité des mécanismes à l'origine de cette cardiomyopathie dépassent les seules capacités antioxydantes de ces molécules. L'évaluation de thérapeutiques comme les IEC qui, en plus de leurs propriétés antioxydantes, possèdent une action sur l'hémodynamique et le remodelage cardiaque, semble plus prometteuse. Leur rôle dans le traitement de l'insuffisance cardiaque n'est plus à démontrer. Cette action semble très précoce dans l'insuffisance cardiaque secondaire à l'administration d'Anthracyclines. L'étude rapportée par Cardinale *et al.* précise que les IEC ont une action bénéfique au stade d'anomalies biologiques avant l'apparition d'un retentissement clinique ou échocardiographique [179]. Cependant, on ne peut pas parler véritablement de rôle protecteur des IEC car ils ne sont pas été administrés avant la 1^{ère} cure de chimiothérapie et une présélection des patients a été réalisée en ne traitant que ceux dont le taux de troponine était élevé et présentaient donc déjà une souffrance myocardique. Des travaux expérimentaux ont montré une véritable activité cardioprotectrice des IEC vis-à-vis des Anthracyclines qui passerait par une préservation des fonctions mitochondriales [183]. Cette protection ne serait malgré tout que transitoire avec un retour à l'état antérieur après quelques années de traitement. L'altération plus tardive de l'expression de certains gènes impliqués dans la fonction contractile du cœur pourrait expliquer en partie « l'échappement » à cette thérapeutique, tout comme l'amplification de la production du stress oxydant qui dépasserait alors les capacités antioxydantes des IEC.

La partie plus clinique de notre travail de thèse a eu pour objectif de comparer la prise en charge et l'évolution à court terme de patientes présentant un infarctus du myocarde et ayant ou non un antécédent de cancer du sein. La prise en charge apparaît indépendante de l'existence d'un antécédent de cancer probablement du fait du relativement bon pronostic de ce cancer lié aux progrès thérapeutiques dans ce domaine. Cependant, il existe une morbi-

mortalité cardiovasculaire plus importante chez ces patientes en post-infarctus qui apparaît liée, d'une part, à un sur-risque rythmique et, d'autre part, à un sur-risque ischémique en particulier cérébral. Si la plus grande survenue de troubles conductifs à long terme chez des patientes ayant eu un cancer du sein est bien documentée et secondaire à l'irradiation médiastinale comme elle était délivrée il ya quelques années, l'existence d'une hyperexcitabilité auriculaire et le plus grand risque d'accidents vasculaires cérébraux sont peu documentées dans la littérature et restent à préciser.

Perspectives

Parmi les mécanismes impliqués dans la cardiotoxicité des Anthracyclines, il apparaît clairement, à la lumière de nos résultats, qu'une étape se joue au niveau de l'expression des gènes. Cette étape fait intervenir l'interaction topoisomérase-Anthracyclines sur laquelle repose l'activité anticancéreuse même de ces molécules. Cette activité passe par la topoisomérase 2 α alors que celle qui médie la cardiotoxicité implique la topoisomérase 2 β [107]. Le Dexrazoxane, aux propriétés chélatrices de fer, actuellement utilisé dans la prévention de la cardiotoxicité des Anthracyclines, semble intervenir au niveau des topoisomérase mais sans distinction entre les 2 isoformes conduisant à une possible réduction de l'activité antitumorale des Anthracyclines. Il apparaît donc intéressant d'envisager le développement d'Anthracyclines plus spécifiques de cette topoisomérase 2 α permettant ainsi de réduire la cardiotoxicité des Anthracyclines en maintenant leur activité antitumorale. L'association entre l'immunothérapie et de la chimiothérapie pourrait alors être une voie prometteuse comme cela est actuellement le cas pour la radiothérapie [31, 54, 184, 185]. Dans l'attente de cette association et à la vue de la complexité des mécanismes physiopathologiques sur lesquels repose la cardiotoxicité des Anthracyclines, il paraît illusoire de vouloir prévenir l'installation des atteintes cardiaques en utilisant une seule molécule.

Dans le cadre de la prise en charge globale des patients, le traitement de la fibrillation auriculaire aussi bien sur le versant anti coagulation que anti arythmique est actuellement en pleine révolution. La période post-infarctus est propice au développement de ces troubles du rythme et représente un marqueur de mauvais pronostic [186-188]. La présence d'un antécédent de cancer du sein semble amplifier ce risque. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces données. Si de nombreuses études ont évalué l'impact des traitements anticancéreux sur le rythme cardiaque à court terme, peu l'ont fait à long terme. Or, il est clairement admis maintenant que la fibrillation auriculaire est un facteur indépendant de mortalité [189, 190]. Il apparaît donc important et simple de réaliser, en plus

d'un suivi échocardiographique, une surveillance rythmique de ces patientes sous la forme de d'ECG ou de holter ECG.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dib, E.G., M.R. Kidd, and D.C. Saltman, *Case reports and the fight against cancer*. J Med Case Reports, 2008. 2: p. 39.
2. Tubiana, M., [*Generalities about carcinogenesis*]. C R Biol, 2008. 331(2): p. 114-25.
3. Chan, V.T. and J.O. McGee, *Cellular oncogenes in neoplasia*. J Clin Pathol, 1987. 40(9): p. 1055-63.
4. Javier, R.T. and J.S. Butel, *The history of tumor virology*. Cancer Res, 2008. 68(19): p. 7693-706.
5. Sarid, R. and S.J. Gao, *Viruses and human cancer: from detection to causality*. Cancer Lett, 2011. 305(2): p. 218-27.
6. Davidson-Moncada, J., F.N. Papavasiliou, and W. Tam, *MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2010. 1183: p. 183-94.
7. Vaish, M., *Mismatch repair deficiencies transforming stem cells into cancer stem cells and therapeutic implications*. Mol Cancer, 2007. 6: p. 26.
8. Monier, R., [*Fundamental aspects: mechanisms of carcinogenesis and dose-effect relationship*]. C R Acad Sci III, 2000. 323(7): p. 603-10.
9. Du, C. and Y. Wang, *The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development*. J Exp Clin Cancer Res. 30: p. 12.
10. Ershler, W.B. and D.L. Longo, *Aging and cancer: issues of basic and clinical science*. J Natl Cancer Inst, 1997. 89(20): p. 1489-97.
11. Weinstein, I.B., *The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture*. Cancer Res, 1988. 48(15): p. 4135-43.
12. Oliveira, P.A., et al., *Chemical carcinogenesis*. An Acad Bras Cienc, 2007. 79(4): p. 593-616.
13. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell. 140(6): p. 883-99.
14. Paul, S. and E. Regulier, [*Molecular basis of oncogenesis*]. Ann Biol Clin (Paris), 2001. 59(4): p. 393-402.
15. Delaval, B. and D. Birnbaum, *A cell cycle hypothesis of cooperative oncogenesis (Review)*. Int J Oncol, 2007. 30(5): p. 1051-8.
16. Morice, P., [*Conservative surgical in oncology*]. Bull Cancer, 2002. 89(12): p. 1001-2.
17. Elias, D., [*Rational of oncological surgery in multimodality treatment of cancers*]. Bull Cancer, 2006. 93(8): p. 775-81.
18. Classe, J.M., et al., [*Surgery for invasive breast cancer*]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2010. 39(8 Suppl): p. F43-62.
19. Schmeler, K.M., M. Frumovitz, and P.T. Ramirez, *Conservative management of early stage cervical cancer: is there a role for less radical surgery?* Gynecol Oncol, 2011. 120(3): p. 321-5.
20. Kawada, K. and M.M. Taketo, *Significance and mechanism of lymph node metastasis in cancer progression*. Cancer Res, 2011. 71(4): p. 1214-8.
21. Leong, S.P., et al., *Impact of nodal status and tumor burden in sentinel lymph nodes on the clinical outcomes of cancer patients*. J Surg Oncol, 2011. 103(6): p. 518-30.
22. Sciubba, D.M., et al., *Diagnosis and management of metastatic spine disease*. J Neurosurg Spine, 2010. 13(1): p. 94-108.

23. Itshayek, E., et al., *Timing of surgery and radiotherapy in the management of metastatic spine disease: a systematic review*. *Int J Oncol*, 2010. 36(3): p. 533-44.
24. Paice, J.A. and B. Ferrell, *The management of cancer pain*. *CA Cancer J Clin*, 2011. 61(3): p. 157-82.
25. Ponsot, P. and P. Hammel, *[Malignant duodenal stenoses: can endoscopic or radiological insertion of metal stent replace surgical derivation?]*. *Gastroenterol Clin Biol*, 2000. 24(8-9): p. 705-7.
26. Nemoto, T., *Endocrine therapy of metastatic breast cancer*. *Keio J Med*, 1987. 36(3): p. 256-61.
27. Kronowitz, S.J. and H.M. Kuerer, *Advances and surgical decision-making for breast reconstruction*. *Cancer*, 2006. 107(5): p. 893-907.
28. Winters, Z.E., J.R. Benson, and A.L. Pusic, *A systematic review of the clinical evidence to guide treatment recommendations in breast reconstruction based on patient-reported outcome measures and health-related quality of life*. *Ann Surg*, 2010. 252(6): p. 929-42.
29. Reed, A.B., *The history of radiation use in medicine*. *J Vasc Surg*. 53(1 Suppl): p. 3S-5S.
30. Cosset, J.M., *[Side effects of ionizing radiation on healthy tissues and organs at risk]*. *Cancer Radiother*, 2010. 14(4-5): p. 228-31.
31. Sadeghi, M., M. Enferadi, and A. Shirazi, *External and internal radiation therapy: past and future directions*. *J Cancer Res Ther*, 2010. 6(3): p. 239-48.
32. Nicolaou, N., *Radiation therapy treatment planning and delivery*. *Semin Oncol Nurs*, 1999. 15(4): p. 260-9.
33. Briot, E., *[Optimisation in brachytherapy]*. *Cancer Radiother*, 2003. 7(2): p. 147-52.
34. Kassis, A.I., *Therapeutic radionuclides: biophysical and radiobiologic principles*. *Semin Nucl Med*, 2008. 38(5): p. 358-66.
35. Hennequin, C., L. Quero, and V. Favaudon, *[Determinants and predictive factors of tumour radiosensitivity]*. *Cancer Radiother*, 2008. 12(1): p. 3-13.
36. Prise, K.M., et al., *New insights on cell death from radiation exposure*. *Lancet Oncol*, 2005. 6(7): p. 520-8.
37. Kumar, P.P., F. Bahrassa, and M.C. Espinoza, *The role of radiotherapy in management of metastatic bone disease*. *J Natl Med Assoc*, 1978. 70(12): p. 909-11.
38. Bolle, S., C. Louis, and P.A. Coucke, *[Innovative technologies in radiation oncology]*. *Rev Med Liege*, 2007. 62(5-6): p. 399-404.
39. Stea, B., et al., *The role of radiation therapy in the control of locoregional and metastatic cancer*. *J Surg Oncol*, 2011. 103(6): p. 627-38.
40. Hong, T.S., et al., *Intensity-modulated radiation therapy: emerging cancer treatment technology*. *Br J Cancer*, 2005. 92(10): p. 1819-24.
41. Kantor, G., et al., *[French national evaluation for heliocidal tomotherapy: description of indications, dose constraints and set-up margins]*. *Cancer Radiother*, 2007. 11(6-7): p. 331-7.
42. Bondiau, P.Y., et al., *[CyberKnife robotic stereotactic radiotherapy: technical aspects and medical indications]*. *Cancer Radiother*, 2007. 11(6-7): p. 338-44.
43. Hannoun-Levi, J.M., et al., *[Robotic radiotherapy for prostate cancer with CyberKnife]*. *Cancer Radiother*, 2007. 11(8): p. 476-82.
44. Joubert, A., et al., *[Radiation biology: Major advances and perspectives for radiotherapy]*. *Cancer Radiother*, 2011. 15(5): p. 348-54.
45. Begg, A.C., F.A. Stewart, and C. Vens, *Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs*. *Nat Rev Cancer*, 2011. 11(4): p. 239-53.

46. Chatal, J.F., et al., *Different ways to improve the clinical effectiveness of radioimmunotherapy in solid tumors*. J Cancer Res Ther, 2009. 5 Suppl 1: p. S36-40.
47. Dy, G.K. and A.A. Adjei, *Systemic cancer therapy: evolution over the last 60 years*. Cancer, 2008. 113(7 Suppl): p. 1857-87.
48. Galmarini, C.M., J.R. Mackey, and C. Dumontet, *Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment*. Lancet Oncol, 2002. 3(7): p. 415-24.
49. Schweitzer, B.I., A.P. Dicker, and J.R. Bertino, *Dihydrofolate reductase as a therapeutic target*. FASEB J, 1990. 4(8): p. 2441-52.
50. Takimoto, C.H., *New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications*. Oncologist, 1996. 1(1 & 2): p. 68-81.
51. Hagner, N. and M. Joerger, *Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis*. Cancer Manag Res. 2: p. 293-301.
52. Siddik, Z.H., *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. Oncogene, 2003. 22(47): p. 7265-79.
53. Dancey, J. and E.A. Eisenhauer, *Current perspectives on camptothecins in cancer treatment*. Br J Cancer, 1996. 74(3): p. 327-38.
54. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. Pharmacol Rev, 2004. 56(2): p. 185-229.
55. McGrogan, B.T., et al., *Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1785(2): p. 96-132.
56. Xiao, H., et al., *Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(27): p. 10166-73.
57. Risinger, A.L., F.J. Giles, and S.L. Mooberry, *Microtubule dynamics as a target in oncology*. Cancer Treat Rev, 2009. 35(3): p. 255-61.
58. Ambudkar, S.V., et al., *P-glycoprotein: from genomics to mechanism*. Oncogene, 2003. 22(47): p. 7468-85.
59. Kimura, Y., et al., *Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1*. Cancer Sci, 2007. 98(9): p. 1303-10.
60. Murphy, M.J., Jr., *Molecular Action and Clinical Relevance of Aromatase Inhibitors*. Oncologist, 1998. 3(2): p. 129-130.
61. de Cremoux, P., et al., *[Tamoxifen and aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer in menopausal women: pharmacological and clinical aspects]*. Bull Cancer, 2004. 91(12): p. 917-27.
62. Ahmad, N. and R. Kumar, *Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics*. Cancer Lett, 2011. 300(1): p. 1-9.
63. Rochefort, H., *[Hormonal carcinogenesis in women: from mechanisms to prevention]*. C R Biol, 2008. 331(2): p. 104-13.
64. Domont, J., et al., *[Neoadjuvant endocrine therapy for breast cancer: an overview]*. Bull Cancer, 2004. 91(1): p. 55-62.
65. *Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials*. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Lancet, 1998. 351(9114): p. 1451-67.
66. Thomas, C. and J.A. Gustafsson, *The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy*. Nat Rev Cancer. 11(8): p. 597-608.
67. Santen, R.J., et al., *History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target*. Endocr Rev, 2009. 30(4): p. 343-75.
68. de Cremoux, P., *[Aromatase inhibitors: pharmacological aspects]*. Bull Cancer, 2000. 87 Spec No: p. 23-29.

69. Lake, D.E. and C. Hudis, *Aromatase inhibitors in breast cancer: an update*. *Cancer Control*, 2002. 9(6): p. 490-8.
70. Tayal, V. and B.S. Kalra, *Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update*. *Eur J Pharmacol*, 2008. 579(1-3): p. 1-12.
71. Margolin, K., *Cytokine therapy in cancer*. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. 8(10): p. 1495-505.
72. Brandau, S. and H. Suttman, *Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement*. *Biomed Pharmacother*, 2007. 61(6): p. 299-305.
73. Aldrich, J.F., et al., *Vaccines and immunotherapeutics for the treatment of malignant disease*. *Clin Dev Immunol*, 2010. 2010: p. 697158.
74. Borghaei, H., M.R. Smith, and K.S. Campbell, *Immunotherapy of cancer*. *Eur J Pharmacol*, 2009. 625(1-3): p. 41-54.
75. Cheng, H. and T. Force, *Why do kinase inhibitors cause cardiotoxicity and what can be done about it?* *Prog Cardiovasc Dis*, 2010. 53(2): p. 114-20.
76. Samant, R.S. and L.A. Shevde, *Recent advances in anti-angiogenic therapy of cancer*. *Oncotarget*, 2011. 2(3): p. 122-34.
77. Gotink, K.J. and H.M. Verheul, *Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?* *Angiogenesis*, 2010. 13(1): p. 1-14.
78. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *N Engl J Med*, 1971. 285(21): p. 1182-6.
79. Giraud, P. and J.M. Cosset, *[Radiation toxicity to the heart: physiopathology and clinical data]*. *Bull Cancer*, 2004. 91 Suppl 3: p. 147-53.
80. Mege, A., et al., *[Radiation-related heart toxicity.]*. *Cancer Radiother*, 2011.
81. Geiger, A.M., W. Chen, and L. Bernstein, *Myocardial infarction risk and tamoxifen therapy for breast cancer*. *Br J Cancer*, 2005. 92(9): p. 1614-20.
82. Pistevou-Gompaki, K., et al., *Evaluation of cardiotoxicity five years after 2D planned, non-simulated, radiation therapy for left breast cancer*. *Ther Clin Risk Manag*, 2008. 4(6): p. 1359-62.
83. Lenihan, D.J. and F.J. Esteva, *Multidisciplinary strategy for managing cardiovascular risks when treating patients with early breast cancer*. *Oncologist*, 2008. 13(12): p. 1224-34.
84. Patt, D.A., et al., *Cardiac morbidity of adjuvant radiotherapy for breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. 23(30): p. 7475-82.
85. Yarnold, J. and M.C. Brotons, *Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis*. *Radiother Oncol*, 2010. 97(1): p. 149-61.
86. Floyd, J.D., et al., *Cardiotoxicity of cancer therapy*. *J Clin Oncol*, 2005. 23(30): p. 7685-96.
87. Berry, G.J. and M. Jordan, *Pathology of radiation and anthracycline cardiotoxicity*. *Pediatr Blood Cancer*, 2005. 44(7): p. 630-7.
88. Bovelli, D., G. Plataniotis, and F. Roila, *Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents and radiotherapy-related heart disease: ESMO Clinical Practice Guidelines*. *Ann Oncol*, 2010. 21 Suppl 5: p. v277-82.
89. Doyen, J., P. Giraud, and Y. Belkacemi, *[Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: cardiac structures]*. *Cancer Radiother*, 2010. 14(4-5): p. 319-26.
90. Dietz, B. and K.G. van der Hem, *Late-onset cardiotoxicity of chemotherapy and radiotherapy*. *Neth J Med*, 2003. 61(6): p. 228-31.
91. Tolba, K.A. and E.N. Deliargyris, *Cardiotoxicity of cancer therapy*. *Cancer Invest*, 1999. 17(6): p. 408-22.

92. Raschi, E., et al., *Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy*. *Pharmacol Ther*, 2010. 125(2): p. 196-218.
93. Monsuez, J.J., et al., *Cardiac side-effects of cancer chemotherapy*. *Int J Cardiol*, 2010. 144(1): p. 3-15.
94. Wouters, K.A., et al., *Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies*. *Br J Haematol*, 2005. 131(5): p. 561-78.
95. Jones, R.L., C. Swanton, and M.S. Ewer, *Anthracycline cardiotoxicity*. *Expert Opin Drug Saf*, 2006. 5(6): p. 791-809.
96. Birtle, A.J., *Anthracyclines and cardiotoxicity*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2000. 12(3): p. 146-52.
97. Delemasure, S., et al., *[Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclins. From basic concepts to clinical data]*. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*, 2006. 55(2): p. 104-12.
98. Plana, J.C., *[Chemotherapy and the heart]*. *Rev Esp Cardiol*, 2011. 64(5): p. 409-15.
99. Senkus, E. and J. Jassem, *Cardiovascular effects of systemic cancer treatment*. *Cancer Treat Rev*, 2011. 37(4): p. 300-11.
100. Hershman, D.L. and A.I. Neugut, *Anthracycline cardiotoxicity: one size does not fit all!* *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(15): p. 1046-7.
101. Yeh, E.T. and C.L. Bickford, *Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 53(24): p. 2231-47.
102. Simunek, T., et al., *Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron*. *Pharmacol Rep*, 2009. 61(1): p. 154-71.
103. Horan, P.G., M.F. McMullin, and P.P. McKeown, *Anthracycline cardiotoxicity*. *Eur Heart J*, 2006. 27(10): p. 1137-8.
104. Sawyer, D.B., et al., *Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection?* *Prog Cardiovasc Dis*, 2010. 53(2): p. 105-13.
105. Franco, V.I., et al., *Cardiovascular effects in childhood cancer survivors treated with anthracyclines*. *Cardiol Res Pract*, 2011. 2011: p. 134679.
106. Appel, J.M., et al., *Anthracycline-induced chronic cardiotoxicity and heart failure*. *Acta Oncol*, 2007. 46(5): p. 576-80.
107. Lyu, Y.L., et al., *Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane*. *Cancer Res*, 2007. 67(18): p. 8839-46.
108. Olson, R.D., et al., *Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(10): p. 3585-9.
109. Bakouboula, B., et al., *[Reversible cardiogenic shock under 5-fluorouracil treatment]*. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*, 2005. 54(4): p. 216-9.
110. Tsibiribi, P., et al., *Cardiotoxicity of 5-fluorouracil in 1350 patients with no prior history of heart disease*. *Bull Cancer*, 2006. 93(3): p. E27-30.
111. Stewart, T., N. Pavlakis, and M. Ward, *Cardiotoxicity with 5-fluorouracil and capecitabine: more than just vasospastic angina*. *Intern Med J*, 2010. 40(4): p. 303-7.
112. Saintigny, P., et al., *[Cardiovascular toxicity of some cancer agents (others than anthracyclines, fluoropyrimidines and trastuzumab)]*. *Bull Cancer*, 2004. 91 Suppl 3: p. 174-84.

113. Salvatorelli, E., et al., *Paclitaxel and docetaxel stimulation of doxorubicinol formation in the human heart: implications for cardiotoxicity of doxorubicin-taxane chemotherapies*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. 318(1): p. 424-33.
114. Minotti, G., et al., *Paclitaxel and docetaxel enhance the metabolism of doxorubicin to toxic species in human myocardium*. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(6): p. 1511-5.
115. Hernandez, R.K., et al., *Tamoxifen treatment in Danish breast cancer patients and 5-year risk of arterial atherosclerotic events: a null association*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008. 17(9): p. 2509-11.
116. Fisher, B., et al., *Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(22): p. 1652-62.
117. Bird, B.R. and S.M. Swain, *Cardiac toxicity in breast cancer survivors: review of potential cardiac problems*. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(1): p. 14-24.
118. Grainger, D.J. and P.M. Schofield, *Tamoxifen for the prevention of myocardial infarction in humans: preclinical and early clinical evidence*. *Circulation*, 2005. 112(19): p. 3018-24.
119. Nordenskjold, B., et al., *Coronary heart disease mortality after 5 years of adjuvant tamoxifen therapy: results from a randomized trial*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(21): p. 1609-10.
120. Costantino, J.P., et al., *Coronary heart disease mortality and adjuvant tamoxifen therapy*. *J Natl Cancer Inst*, 1997. 89(11): p. 776-82.
121. Cushman, M., et al., *Tamoxifen and cardiac risk factors in healthy women: Suggestion of an anti-inflammatory effect*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(2): p. 255-61.
122. Elisaf, M.S., et al., *Tamoxifen-induced severe hypertriglyceridemia and pancreatitis*. *Ann Oncol*, 2000. 11(8): p. 1067-9.
123. Ewer, M.S. and S. Gluck, *A woman's heart: the impact of adjuvant endocrine therapy on cardiovascular health*. *Cancer*, 2009. 115(9): p. 1813-26.
124. Williams, J.K., et al., *Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(2): p. 403-8.
125. Geiger, A.M., et al., *Stroke risk and tamoxifen therapy for breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(20): p. 1528-36.
126. Towns, K., P.L. Bedard, and S. Verma, *Matters of the heart: cardiac toxicity of adjuvant systemic therapy for early-stage breast cancer*. *Curr Oncol*, 2008. 15(Suppl 1): p. S16-29.
127. Howell, A. and J. Cuzick, *Vascular effects of aromatase inhibitors: data from clinical trials*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005. 95(1-5): p. 143-9.
128. Bria, E., et al., *Trastuzumab cardiotoxicity: biological hypotheses and clinical open issues*. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. 8(12): p. 1963-71.
129. Campone, M., E. Bourbouloux, and P. Fumoleau, *[Cardiac dysfunction induced by trastuzumab]*. *Bull Cancer*, 2004. 91 Suppl 3: p. 166-73.
130. Mellor, H.R., et al., *Cardiotoxicity associated with targeting kinase pathways in cancer*. *Toxicol Sci*, 2011. 120(1): p. 14-32.
131. McArthur, H.L. and S. Chia, *Cardiotoxicity of trastuzumab in clinical practice*. *N Engl J Med*, 2007. 357(1): p. 94-5.
132. Force, T., D.S. Krause, and R.A. Van Etten, *Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition*. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(5): p. 332-44.

133. Zambelli, A., et al., *Predicting and preventing cardiotoxicity in the era of breast cancer targeted therapies. Novel molecular tools for clinical issues.* Breast, 2011. 20(2): p. 176-83.
134. Guglin, M., R. Cutro, and J.D. Mishkin, *Trastuzumab-induced cardiomyopathy.* J Card Fail, 2008. 14(5): p. 437-44.
135. Yeh, E.T., *Cardiotoxicity induced by chemotherapy and antibody therapy.* Annu Rev Med, 2006. 57: p. 485-98.
136. Sonnenblick, M. and A. Rosin, *Cardiotoxicity of interferon. A review of 44 cases.* Chest, 1991. 99(3): p. 557-61.
137. Chu, T.F., et al., *Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib.* Lancet, 2007. 370(9604): p. 2011-9.
138. Orphanos, G.S., G.N. Ioannidis, and A.G. Ardavanis, *Cardiotoxicity induced by tyrosine kinase inhibitors.* Acta Oncol, 2009. 48(7): p. 964-70.
139. Migdal, C. and M. Serres, [*Reactive oxygen species and oxidative stress*]. Med Sci (Paris), 2011. 27(4): p. 405-12.
140. Menna, P., E. Salvatorelli, and G. Minotti, *Anthracycline degradation in cardiomyocytes: a journey to oxidative survival.* Chem Res Toxicol, 2010. 23(1): p. 6-10.
141. Kuznetsov, A.V., et al., *Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death.* Biochim Biophys Acta, 2011. 1813(6): p. 1144-52.
142. Zhao, Y., et al., *Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy.* Cancer Res, 2010. 70(22): p. 9287-97.
143. Menna, P., E. Salvatorelli, and G. Minotti, *Doxorubicin degradation in cardiomyocytes.* J Pharmacol Exp Ther, 2007. 322(1): p. 408-19.
144. Liu, B., et al., *Nitric oxide synthase expressions in ADR-induced cardiomyopathy in rats.* J Biochem Mol Biol, 2006. 39(6): p. 759-65.
145. Doroshov, J.H., G.Y. Locker, and C.E. Myers, *Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin.* J Clin Invest, 1980. 65(1): p. 128-35.
146. Crohns, M., et al., *Local and systemic oxidant/antioxidant status before and during lung cancer radiotherapy.* Free Radic Res, 2009. 43(7): p. 646-57.
147. Khanzode, S.S., et al., *Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer.* Free Radic Res, 2004. 38(1): p. 81-5.
148. Kizek, R., et al., *Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances.* Pharmacol Ther.
149. Junjing, Z., Z. Yan, and Z. Baolu, *Scavenging effects of dexrazoxane on free radicals.* J Clin Biochem Nutr, 2010. 47(3): p. 238-45.
150. Swain, S.M., et al., *Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer.* J Clin Oncol, 1997. 15(4): p. 1318-32.
151. Yan, T., et al., *Topoisomerase II{alpha}-dependent and -independent apoptotic effects of dexrazoxane and doxorubicin.* Mol Cancer Ther, 2009. 8(5): p. 1075-85.
152. Lipshultz, S.E., et al., *The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia.* N Engl J Med, 2004. 351(2): p. 145-53.
153. Lipshultz, S.E., et al., *Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial.* Lancet Oncol, 2010. 11(10): p. 950-61.

154. Choi, H.S., et al., *Dexrazoxane for preventing anthracycline cardiotoxicity in children with solid tumors*. J Korean Med Sci, 2010. 25(9): p. 1336-42.
155. Hensley, M.L., et al., *American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants*. J Clin Oncol, 2009. 27(1): p. 127-45.
156. Santini, V., *Amifostine: chemotherapeutic and radiotherapeutic protective effects*. Expert Opin Pharmacother, 2001. 2(3): p. 479-89.
157. Li, T., et al., *Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats*. Cardiovasc Res, 2000. 46(3): p. 523-30.
158. Li, T. and P.K. Singal, *Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol*. Circulation, 2000. 102(17): p. 2105-10.
159. Siveski-Iliskovic, N., et al., *Probuco protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect*. Circulation, 1995. 91(1): p. 10-5.
160. Park, E.S., et al., *Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats*. J Vet Sci, 2003. 4(2): p. 129-36.
161. Doroshow, J.H., et al., *Prevention of doxorubicin cardiac toxicity in the mouse by N-acetylcysteine*. J Clin Invest, 1981. 68(4): p. 1053-64.
162. Oliveira, P.J., et al., *Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. 200(2): p. 159-68.
163. Arozal, W., et al., *Protective effect of carvedilol on daunorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats*. Toxicology. 274(1-3): p. 18-26.
164. Spallarossa, P., et al., *Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro*. J Mol Cell Cardiol, 2004. 37(4): p. 837-46.
165. Machado, V., et al., *Carvedilol as a protector against the cardiotoxicity induced by anthracyclines (doxorubicin)*. Rev Port Cardiol, 2008. 27(10): p. 1277-96.
166. Ibrahim, M.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT(1)-receptor antagonism equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity*. Pharmacol Res, 2009. 60(5): p. 373-81.
167. Iqbal, M., et al., *Protective effects of telmisartan against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats*. Pharmacol Rep, 2008. 60(3): p. 382-90.
168. Cadeddu, C., et al., *Protective effects of the angiotensin II receptor blocker telmisartan on epirubicin-induced inflammation, oxidative stress, and early ventricular impairment*. Am Heart J, 2010. 160(3): p. 487 e1-7.
169. Quiles, J.L., et al., *Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity*. Toxicology, 2002. 180(1): p. 79-95.
170. Ghibu, S., et al., *Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases*. J Cardiovasc Pharmacol, 2009. 54(5): p. 391-8.
171. Ghibu, S., et al., *[An endogenous dithiol with antioxidant properties: alpha-lipoic acid, potential uses in cardiovascular diseases]*. Ann Cardiol Angeiol (Paris), 2008. 57(3): p. 161-5.
172. Granados-Principal, S., et al., *New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients*. Food Chem Toxicol. 48(6): p. 1425-38.
173. Conklin, K.A., *Cancer chemotherapy and antioxidants*. J Nutr, 2004. 134(11): p. 3201S-3204S.

174. Shimpo, K., et al., *Ascorbic acid and adriamycin toxicity*. Am J Clin Nutr, 1991. 54(6 Suppl): p. 1298S-1301S.
175. Kalender, S., et al., *Protective role of antioxidant vitamin E and catechin on idarubicin-induced cardiotoxicity in rats*. Braz J Med Biol Res, 2002. 35(11): p. 1379-87.
176. Al-Majed, A.A., et al., *Alpha-lipoic acid ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin*. Pharmacol Res, 2002. 46(6): p. 499-503.
177. Delgado, R.M., 3rd, et al., *Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment improves left ventricular function and mortality in a murine model of doxorubicin-induced heart failure*. Circulation, 2004. 109(11): p. 1428-33.
178. Silber, J.H., et al., *Enalapril to prevent cardiac function decline in long-term survivors of pediatric cancer exposed to anthracyclines*. J Clin Oncol, 2004. 22(5): p. 820-8.
179. Cardinale, D., et al., *Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition*. Circulation, 2006. 114(23): p. 2474-81.
180. Lipshultz, S.E., et al., *Long-term enalapril therapy for left ventricular dysfunction in doxorubicin-treated survivors of childhood cancer*. J Clin Oncol, 2002. 20(23): p. 4517-22.
181. Yoon, G.J., et al., *Left ventricular dysfunction in patients receiving cardiotoxic cancer therapies are clinicians responding optimally?* J Am Coll Cardiol, 2010. 56(20): p. 1644-50.
182. Urbanova, D., et al., *Heart transplant in a childhood leukemia survivor: a case report*. Exp Clin Transplant. 8(1): p. 79-81.
183. Hiona, A., et al., *Pretreatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor improves doxorubicin-induced cardiomyopathy via preservation of mitochondrial function*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011. 142(2): p. 396-403 e3.
184. Seymour, L.W., et al., *Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin*. J Clin Oncol, 2002. 20(6): p. 1668-76.
185. Roffler, S.R., J. Chan, and M.Y. Yeh, *Potentiation of radioimmunotherapy by inhibition of topoisomerase I*. Cancer Res, 1994. 54(5): p. 1276-85.
186. Lin, C.J., et al., *The prognostic value of atrial fibrillation on 30-day clinical outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention*. Int Heart J. 52(3): p. 153-8.
187. Pedersen, O.D., et al., *Increased risk of sudden and non-sudden cardiovascular death in patients with atrial fibrillation/flutter following acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2006. 27(3): p. 290-5.
188. Dziewierz, A., et al., *Prognostic significance of new onset atrial fibrillation in acute coronary syndrome patients treated conservatively*. Cardiol J. 17(1): p. 57-64.
189. Ohsawa, M., et al., *Mortality risk attributable to atrial fibrillation in middle-aged and elderly people in the Japanese general population: nineteen-year follow-up in NIPPON DATA80*. Circ J, 2007. 71(6): p. 814-9.
190. Wattigney, W.A., G.A. Mensah, and J.B. Croft, *Increased atrial fibrillation mortality: United States, 1980-1998*. Am J Epidemiol, 2002. 155(9): p. 819-26.

Etude de la cardiotoxicité des traitements anti-cancéreux

Résumé: Malgré le développement de nouvelles thérapeutiques anti-tumorales telles que les anti-tyrosine kinases ou les traitements anti-angiogéniques, la mortalité par cancer reste élevée. Les nouvelles molécules associées aux progrès réalisés en chirurgie, en radiothérapie et en chimiothérapie ont permis d'allonger la durée de vie de ces patients permettant de mieux apprécier le retentissement, à long terme, de ces thérapeutiques sur le système cardiovasculaire. Il apparaît que la prescription de nombreuses chimiothérapies dont les anthracyclines conduisent à une altération de la fonction cardiaque. Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de cette dysfonction cardiaque sont complexes, intriqués et restent partiellement méconnus. Afin de limiter cette cardiotoxicité, différentes voies portant sur les modalités d'administration, la galénique et la co-prescription de molécules à visée cardioprotectrice sont explorées. Une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans cette cardiotoxicité est donc nécessaire afin de prévenir son apparition. Il convient, par ailleurs, de préciser l'impact du cancer et des traitements anticancéreux sur le pronostic cardiovasculaire afin que ces patients bénéficient d'un suivi adapté.

Dans la **partie expérimentale** de notre travail, les objectifs étaient d'étudier le stress oxydant plasmatique et tissulaire à court terme et à long terme après l'administration d'anthracyclines ainsi que les modifications de l'expression de certains gènes myocardiques secondaires à cette thérapeutique. Parallèlement, le caractère potentiellement cardioprotecteur des inhibiteurs de l'enzyme de conversion et de l'acide alpha-lipoïque était évalué. En accord avec la littérature, l'administration d'anthracyclines s'est accompagnée d'une augmentation du stress oxydant, aussi bien lors de l'évaluation à court terme qu'à long terme après l'arrêt du traitement. Une perturbation dans l'expression de différents gènes myocardiques a été constatée à distance de l'arrêt du traitement expliquant que la cardiomyopathie toxique induite par les anthracyclines puisse se révéler plusieurs années après l'interruption de cette chimiothérapie. Qu'il s'agisse des inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou de l'acide alpha-lipoïque, ces molécules n'ont pas permis de prévenir l'atteinte cardiaque et le déséquilibre, espèces oxydantes/protections antioxydantes, qui accompagnent les effets des anthracyclines. Notre travail souligne la multiplicité et la complexité des mécanismes intervenant dans la cardiotoxicité des anthracyclines ainsi que la nécessité de nouvelles voies de recherche dans cette cardioprotection.

La **partie clinique** de notre travail avait pour objectif de comparer la prise en charge, les caractéristiques et le pronostic de patientes hospitalisées pour un infarctus du myocarde et ayant antécédent de cancer du sein par rapport à des patientes sans antécédent de cancer du sein. Bien que notre étude précise que nos 2 populations étaient comparables en termes de facteurs de risques cardiovasculaires, de type d'infarctus, de technique de revascularisation et de thérapeutiques administrées lors de la phase aiguë, les patientes ayant un antécédent de cancer du sein semblent posséder un moins bon pronostic cardiovasculaire en post-infarctus du myocarde. L'existence d'un antécédent de cancer du sein apparaît comme un facteur indépendant de survenue d'événements cardiovasculaires rythmiques et non-rythmiques durant cette période. Ces nouvelles données doivent être confirmées par des études de plus grande taille mais montrent déjà la nécessité d'un suivi cardiovasculaire étroit de cette population de patients, aussi bien sur la plan ischémique que rythmique.

Mots clés: cancer, cardiotoxicité, anthracyclines, stress oxydant, pronostic cardiovasculaire.