

Molécules cytotoxiques des cellules hypoxiques : vers une spécificité thérapeutique anticancéreuse

Éric Lartigau, Marcelle Guichard

L'action biologique des radiations ionisantes possédant un transfert linéique d'énergie faible (photons γ) dépend pour une large part de la pression partielle en oxygène (pO_2) présente dans l'environnement cellulaire au moment de l'irradiation. L'oxygène intervient dans les réactions radiolytiques du fait de sa structure biradicalaire. Il réagit avec les radicaux libres en formant une paire d'électrons plus stable que deux électrons célibataires [1]. Les radicaux intermédiaires obtenus avant la réduction en eau sont responsables des effets cytotoxiques dits « indirects ». Le rapport des doses nécessaires en hypoxie sévère ($< 0,02$ kPa, 1 kPa = $7,5$ mmHg) et en normoxie pour obtenir un même effet biologique (survie cellulaire) est de 3; il est appelé FAO (facteur d'amplification de l'oxygène) [1]. Pour des pO_2 comprises entre 0 et 4 kPa, la radiosensibilité augmente rapidement. Pour des pO_2 supérieures, le gain en sensibilité est très faible même en utilisant des pressions hyperbares [1].

L'oxygénation tumorale

Une diminution de la pression partielle en oxygène intratumorale pourrait expliquer certains échecs de la radiothérapie du fait de la présence de cellules clonogènes moins bien oxygénées. Depuis 1955, la présence dans les tumeurs de zones en hypoxie permanente a été démontrée. De plus, les tumeurs possèdent des zones où le flux sanguin est intermittent et irrégulier;

un collapsus des vaisseaux sanguins et une augmentation de pressions interstitielles sont responsables d'une hypoxie tissulaire aiguë ou transitoire [2, 3]. La présence de cellules tumorales susceptibles d'engendrer des clones insensibles à la radiothérapie par manque d'oxygène a été établie dans les tumeurs murines et humaines hétérotransplantées [4, 5]. Chez l'homme, des mesures de la pO_2 intratissulaire réalisées dans des tumeurs du col utérin, du sein et de la sphère ORL [6-12] ont permis de détecter des zones présentant des valeurs d'oxygénation basses et d'évaluer l'impact de facteurs modifiant l'oxygénation tissulaire, comme le carbogène (95 % O_2 , 5 % CO_2). Une diminution, quasi constante, de l'oxygénation dans les tumeurs humaines par rapport aux tissus sains avoisinants a été mise en évidence dans les trois sites tumoraux étudiés à l'Institut Gustave-Roussy entre 1990 et 1994 [7-9]. Pour les patients porteurs de tumeurs ORL, la pO_2 médiane est de 7 kPa dans les tissus sains et de 1,33 kPa (10 mmHg) dans les tumeurs, avec 25 % des valeurs recueillies inférieures à 0,26 kPa (2 mmHg) [8, 9]. Le pourcentage de pO_2 très basses ($< 0,26$ kPa) dans le ganglion métastatique est significativement augmenté en cas d'accroissement du volume tumoral (ganglion N2 versus N3, $p < 10^{-4}$) [8]. L'inhalation de carbogène a pour conséquence l'élévation globale de la pO_2 , la pO_2 médiane intratumorale devenant équivalente à celle des tissus sains. Néanmoins, des valeurs très basses restent présentes chez 1/3

des patients [10]. Le but essentiel de telles études est de corréler la radiosensibilité à une pO_2 donnée, c'est-à-dire d'avoir un test prédictif du contrôle local de la maladie traitée grâce à un paramètre biologique mesuré avant traitement. La mesure de la pO_2 avant traitement par radiothérapie est, en étude multiparamétrique, un facteur pronostique majeur du contrôle local de tumeurs du col utérin et de la sphère ORL [11, 12]. Enfin, de nouveaux concepts sur le rôle de l'hypoxie comme marqueur des tumeurs sont en plein développement [13]. Un champ d'investigation s'est ouvert avec la mise en évidence du rôle de la pression partielle de l'oxygène dans la modulation de l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs (*P53*) ou dans certains mécanismes apoptotiques intervenant dans les cellules tumorales [14, 15].

Molécules cytotoxiques des cellules hypoxiques

Afin de diminuer la proportion de cellules clonogènes hypoxiques, ou de limiter leur impact sur la réponse aux traitements, de très nombreuses voies de recherche ont été développées. Citons par exemple: l'emploi de particules, tels les ions lourds, dont l'efficacité biologique dépend moins de la présence d'oxygène que les rayons X, l'utilisation de substances électrophiles, d'oxygène (normobare ou hyperbare), de transporteurs d'oxygène ou de molécules vaso-actives (nicotinamide) [16-18]. Le rôle de l'hypoxie tumorale en tant que facteur de radiorésistance

ayant été largement mis en évidence dans les tumeurs expérimentales, l'association d'une molécule réduisant la vasoconstriction des vaisseaux tumoraux et d'un gaz augmentant la quantité d'oxygène dissous dans le sang et les tissus, devrait réduire l'influence de l'hypoxie sur l'effet biologique des radiations ionisantes. Tous les résultats obtenus sur des tumeurs expérimentales ont été très encourageants; néanmoins, ceux obtenus dans le cadre d'essais thérapeutiques restent divergents, sans doute du fait de la difficulté à sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une amélioration de leur oxygénation tumorale [19].

Une voie d'approche intéressante pourrait associer des techniques augmentant l'oxygénation tissulaire, à des molécules cytotoxiques des cellules hypoxiques, cellules dont on peut penser que certaines persistent pendant le traitement [20]. Les molécules dites bioréductrices, appelées *bioreductive drugs* en anglais, sont activées en composés cytotoxiques [21] dans des zones hypoxiques (présentant des pO₂ très basses) si les enzymes nécessaires à la bioréduction sont présentes [21]. La différence d'oxygénation entre tissus sains et tumeurs devrait permettre l'utilisation de ces molécules cytotoxiques en clinique avec une toxicité réduite pour les tissus sains [21]. Ces molécules comprennent des dérivés imidazolés et des antibiotiques de la famille des quinolones, dont le principal agent est la mitomycine-C. Les résultats obtenus en clinique avec les dérivés imidazolés ont été décevants, notamment du fait de l'impossibilité de délivrer des concentrations suffisantes sans toxicité neurologique périphérique [19]. En revanche, un essai thérapeutique, réalisé à l'université de Yale, a démontré un bénéfice clinique à associer mitomycine-C et radiothérapie après chirurgie première de tumeurs ORL, bien que cette molécule ne soit métabolisée en composés cytotoxiques qu'à des pO₂ extrêmement basses [22]. De nouveaux agents bioréducteurs ont été développés. La molécule la plus intéressante semble être une benzotriazine di-N-oxide, la tirapazamine (SR-4233) [23-26]. Sa cytotoxicité a été largement étudiée sur des modèles murins et humains *in vitro* et *in vivo*. Le rapport de cytotoxicité (rapport des

| Tableau I | | | | |
|--|--------|-------|-------------------|--------------------|
| SURVIE CELLULAIRE DANS LES DIFFÉRENTES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES: CYTOTOXICITÉ <i>IN VITRO</i> DE LA TIRAPAZAMINE POUR UNE LIGNÉE DE MÉLANOME HUMAIN (Na 11 ⁺) | | | | |
| | Survie | | Survie espérée | Survie observée |
| | 2 Gy | 10 µM | 2 Gy + 10 µM | |
| pO₂ (kPa) | | | | |
| 20,6 | 0,47 | 1 | 0,47 | 0,27 |
| 10 | 0,61 | 0,76 | 0,46 | 0,31 |
| 2 | 0,68 | 0,72 | 0,49 | 0,21 |
| 0,26 | 0,66 | 0,45 | 0,29 | 0,071 |
| 0,02 | 0,97 | 0,36 | 0,34 | 0,0025 |

2 Gy: dose unique de 2 Gy, 10 µM: incubation pendant 1 heure en présence de 10 µM de tirapazamine à la pO₂ donnée. Survie espérée avec l'association: produit des survies obtenues expérimentalement avec chacune des modalités utilisée seule.

| Tableau II | |
|--|---------------------------------|
| TEMPS DE DOUBLEMENT POUR UNE LIGNÉE DE MÉLANOME HUMAIN (Na 11 ⁺) | |
| Molécule | Temps de doublement (jours) |
| (mg/kg × 4) | (intervalle de confiance à 95%) |
| témoin | 14,6 (9,9-19,2) |
| tirapazamine (36) | 12,9 (11,7-14,2) |
| VP16 (20) | 17,4 (13,4-25,5) |
| DTIC (125) | 21,7 (17,8-25,7) |
| tirapazamine (36) + VP16 (20) | 22,4 (10,0-34,8) |
| tirapazamine (36) + DTIC (125) | 23,5 (18,5-28,5) |

En gras: différence significative avec les témoins ou avec le groupe tirapazamine.

doses d'irradiation qu'il faut administrer dans l'air et en hypoxie pour obtenir une survie cellulaire donnée) varie de 25 à 200. En faveur de son utilisation clinique, la tirapazamine est cytotoxique à des pO₂ retrouvées *in vivo* dans les tumeurs et peu présentes dans les tissus sains. Ainsi, une cytotoxicité très significative est démontrée pour des concentrations de 50 µM à des pO₂ < 2 kPa. Pour des concentrations de 10 µM de tirapazamine, une incubation d'une heure suivie d'une irradiation (dose unique de 2 Gy) ne modifie pas la survie dans l'air, à 10 ou 2 kPa [22]. En revanche, pour des pO₂ < 0,26 kPa, on observe une diminution significative (facteur 100) de la survie cellulaire avec l'association (tirapazamine + 2 Gy),

comparée à 10 µM tirapazamine seule ou 2 Gy seuls (p<0,03) (Tableau I). Les résultats obtenus *in vivo* (méthode des colonies par excision tumorale ou retard à la croissance tumorale) montrent une augmentation de la mort cellulaire lorsque la tirapazamine est administrée dans l'heure précédent une irradiation unique (20 Gy) ou fractionnée (8 × 2,5 Gy) [23, 24]. On a évalué la cytotoxicité de l'association de la tirapazamine à différentes molécules de chimiothérapie (VP16, DTIC et cisplatine) chez la souris *nude* porteuse d'une tumeur humaine (Na1 1⁺: mélanome pigmenté). La létalité (LD10%) est très augmentée en cas d'association de la tirapazamine à d'autres molécules [26]. Une diminution significa-

tive du coefficient de clonage ($p=0,04$) est trouvée quand la tirapazamine et le cis-platine sont incubés simultanément par comparaison au cis-platine ou à la tirapazamine seuls. L'association tirapazamine + VP 16 ou DTIC augmente significativement le temps de doublement tumoral (Tableau II) par rapport aux animaux témoins ou traités avec chacune des molécules ($p=0,001$).

Ces résultats extrêmement encourageants, ouvrent la voie à une utilisation clinique des molécules cytotoxiques des cellules hypoxiques. On voit l'intérêt théorique qu'il y aurait à combiner de telles molécules à la radiothérapie, modalités de traitement agissant sur deux populations cellulaires différentes au sein d'une même tumeur. Des essais thérapeutiques de phase III débutent actuellement en Europe et aux États-Unis chez des patients porteurs de tumeurs ORL ou bronchiques ■

Éric Lartigau

Assistant.

Marcelle Guichard

Directeur de recherche au Cnrs.

Laboratoire de radiosensibilité et de radiocarcinogénèse, Département de radiothérapie, Institut Gustave-Roussy, 94805, Villejuif Cedex, France.

RÉFÉRENCES

- Lartigau E, Guichard M, Ferradini C. Oxygène et radiations ionisantes. *J Chimie Physique* 1994; 91: 1140-8.
- Jain RK. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* 1988; 48: 2641-58.
- Chaplin DJ, Durand RE, Olive PL. Acute hypoxia in tumours: implications for modifiers of radiation effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 1091-5.
- Guichard M. Comparison of the radiobiological properties of human tumour xenografts and rodent tumours. *Int J Radiat Biol* 1989; 56: 583-6.
- Chapman JD. Measurement of tumor hypoxia by invasive and non invasive procedures: a review of recent clinical studies. *Radiother Oncol* 1991; 20: 13-9.
- Vaupel PW. Oxygenation of human tumors. *Stralther Onkol* 1990; 166: 377-86.
- Lartigau E, Vitu L, Haie-Meder C, Cosset MF, Delapierre M, Gerbaulet A, Eschwege F, Guichard M. Feasibility of measuring oxygen tension in uterine cervix carcinoma. *Eur J Cancer* 1992; 28: 1354-7.
- Lartigau E, Le Ridant AM, Lambin P, et al. Oxygenation of head and neck tumors. *Cancer* 1993; 71: 2319-25.
- Lartigau E, Randrianarivelo H, Martin L, et al. Oxygen tension measurements in human tumors: the Institut Gustave-Roussy Experience. *Radiat Oncol Invest* 1994; 1: 285-91.
- Martin L, Lartigau E, Weeger P, Lambin P, Le Ridant AM, Lusinchi A, Wibault P, Eschwege F, Luboinski B, Guichard M. Changes in the oxygenation of head and neck tumours during carbogen breathing. *Radiother Oncol* 1993; 27: 123-30.
- Höckel M, Vorndran B, Schlenger K, Bausmann E, Knapstein PG. Tumor oxygenation: a new predictive parameter in locally advanced cancer of the uterine cervix. *Gyn Oncol* 1993; 51: 141-9.
- Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 1996; 41: 31-9.
- Stone HB, Brown JM, Philips TL, Sutherland RM. Oxygen in human tumors: correlation between methods of measurements and response to therapy. *Radiat Res* 1993; 136: 422-34.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379: 88-91.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389: 300-5.
- Dische S. Chemical sensitizers for hypoxic cells: a decade of experience in clinical radiotherapy. *Radiother Oncol* 1985; 3: 97-115.
- Henk JM. Does hyperbaric oxygen have a future in radiation therapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981; 7: 1125-8.
- Simon JM, Lartigau E, Guichard M. Nicotinamide and carbogen: major effect on the radiosensitivity of EMT6 and HRT18 tumours. *Radiother Oncol* 1993; 28: 203-7.
- Overgaard J. Importance of tumour hypoxia in radiotherapy. A meta-analysis of controlled clinical trials. *Radiother Oncol* 1991; 24: S64.
- Teicher BA, Lazo JS, Sartorelli AC. Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities towards oxygenated and hypoxic tumour cell. *Cancer Res* 1981; 41: 73-81.
- Workman P, Stratford IJ. The experimental development of bioreductive drugs and their role in cancer therapy. *Cancer Met Rev* 1993; 12: 73-82.
- Weissberg JB, Son YH, Papac RJ, Sasaki C, Fischer DB, Lawrence R. Randomized clinical trial of mitomycin C as an adjunct to radiotherapy in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17: 3-9.
- Zeman EM, Brown JM, Lemmon MJ, Hirst VK, Lee WW. SR-4233: a new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 1239-42.
- Zeman EM, Hirst VW, Lemmon MJ, Brown JM. Enhancement of radiation-induced tumour cell killing by the hypoxic cell toxin SR-4233. *Radiother Oncol* 1988; 12: 209-18.
- Lartigau E, Guichard M. Does tirapazamine (SR-4233) have any effect on the surviving fraction of 3 human cell lines at clinically relevant partial oxygen pressure? *Int J Radiat Biol* 1995; 21: 211-6.
- Lartigau E, Guichard M. The effect of tirapazamine (SR-4233) alone or combined with chemotherapeutic agents on xenografted human tumours. *Br J Cancer* 1996; 73: 1480-5.

TIRÉS À PART

E. Lartigau.

XII^{es} Journées de Biologie de Marseille

10/11 septembre 1998 - Faculté de Pharmacie

Syndicat des Directeurs de Laboratoires de Biologie Médicale des Bouches-du-Rhône
16, rue Dragon, 13006 Marseille, France

Secrétariat : CO2, 10, boulevard Rivet, 13008 Marseille - Téléphone 04 91 23 06 60 - Télécopie 04 91 23 06 69