

## **L**e céramide à l'origine de la cardiotoxicité de la doxorubicine ?

**E**n clinique humaine, les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine et daunorubicine) sont des agents antitumoraux très largement utilisés en cancérologie. Toutefois, un certain nombre d'effets secondaires, notamment sur l'hématopoïèse et la fonction cardiaque, limitent leur utilisation. La cardiotoxicité consiste en une insuffisance cardiaque d'apparition retardée dont la fréquence est proportionnelle à la dose cumulée.

Même s'il est habituel de respecter la dose cumulative de 550 mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle du produit, la toxicité cardiaque des anthracyclines limite beaucoup son utilisation pour les raisons suivantes: (1) l'insuffisance cardiaque peut survenir dès les premiers cycles de traitement avant d'atteindre la dose cumulative; (2) les anthracyclines sont proscrites chez les patients dont la fonction myocardique est altérée; (3) la toxicité cardiaque s'oppose à l'utilisation de fortes doses d'anthracyclines alors que les conséquences de la toxicité hématologique peuvent être contournées, au moins partiellement, par l'utilisation thérapeutique de facteurs de croissance hématopoïétiques.

Au niveau cellulaire, le mécanisme par lequel les anthracyclines exercent leur cardiotoxicité est encore mal compris. En effet, pour les cellules tumorales, il est classiquement admis que le mécanisme principal de cytotoxicité est lié à l'interaction du produit avec l'ADN, en particulier avec la topo-isomérase II nucléaire [1]. Or, cette enzyme est très peu exprimée dans les cellules quiescentes sur le plan prolifératif, comme le sont les cellules cardiaques. Ce constat a encouragé la recherche d'autres mécanismes susceptibles de

rendre compte de la toxicité cardiaque. Ainsi, une accumulation de Ca<sup>2+</sup> intracytosolique, des altérations de la transcription de gènes codant pour certaines protéines de l'appareil sarcomérique, la stimulation de différentes protéine-kinases ou encore l'induction d'un *stress oxydant* ont été incriminés [2]. En effet, la sensibilité particulière du cœur aux anthracyclines serait liée à un déficit relatif des défenses anti-oxydantes des myocytes cardiaques par comparaison à d'autres tissus, ce que traduit un taux relativement bas de superoxyde dismutase et de catalase et un faible taux de renouvellement du glutathion. Cependant, l'implication du *stress oxydant* dans la cytotoxicité des anthracyclines reste très controversée car la toxicité cardiaque de la doxorubicine ne se traduit pas systématiquement par la production de radicaux libres oxygénés mais aussi parce que les anti-oxydants ne préviennent pas toujours la cardiotoxicité des anthracyclines [2]. En effet, des agents anti-oxydants, tels que la N-acétylcystéine ou l'association  $\alpha$ -tocophérol-acide ascorbique sont incapables de protéger les myocytes isolés de ventricules de rats nouveau-nés de l'apoptose induite par 1  $\mu$ M de daunorubicine. Au contraire, le dexrazoxane, un chélateur du fer, est, lui, capable de limiter la toxicité cardiaque des anthracyclines [3]. En fait, la responsabilité d'un *stress oxydant* dans la cardiotoxicité des anthracyclines, que ce *stress* agisse ou non en induisant l'apoptose des cellules myocardiques, n'est en rien exclusif d'autres hypothèses étiopathogéniques et les mécanismes moléculaires de cytotoxicité des anthracyclines vis-à-vis du myocarde restent à préciser.

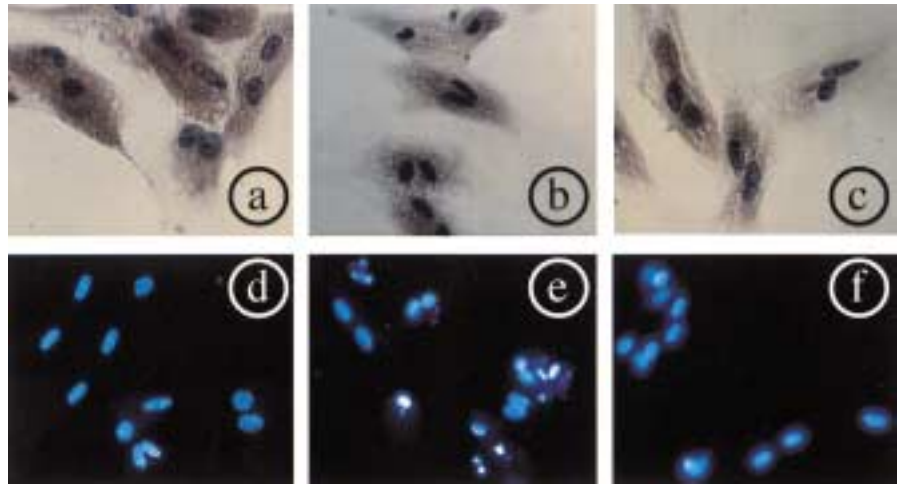
Une des hypothèses qui pourrait expliquer la perte progressive des myocytes cardiaques dans certaines situations telles que l'insuffisance cardiaque, l'hypertrophie ou l'infarctus du myocarde, repose sur la survenue d'un processus d'apoptose dans le myocarde atteint [4]. L'apoptose des myocytes cardiaques peut être induite *in vitro* par l'ajout de TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) [5] ou par un stimulus hypoxique [6]. En ce qui concerne l'effet cardiotoxique de la doxorubicine, nous avons montré qu'*in vitro*, une incubation courte (1 h) de myocytes ventriculaires de rat adulte avec de faibles concentrations de doxorubicine (0,1-0,5  $\mu$ M), semblables à celles qui sont obtenues *in vivo* au pic de concentration plasmatique après administration en *bolus* de doses conventionnelles, entraînait une apoptose cellulaire tardive, culminant à sept jours de culture [7, 8]. Cependant, les voies de signalisation mises en jeu au cours de cette apoptose restaient à identifier.

Une des approches utilisées pour déterminer la nature, la fonction et la régulation de molécules pouvant jouer un rôle dans la transmission du signal apoptotique, repose sur l'utilisation de molécules cardioprotectrices. En effet, Wang *et al.* [9] ont montré que l'IGF (*insulin-like growth factor*), dont la surexpression chez la souris protège les cellules myocardiques de l'apoptose induite lors d'un infarctus, tout en atténuant la dilatation ventriculaire et l'hypertrophie myocardique [9], peut aussi inhiber l'apoptose induite par la doxorubicine en bloquant l'induction de Bax et l'activation de la caspase 3 [10]. De façon similaire, le carvedilol, antagoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, qui possède égale-

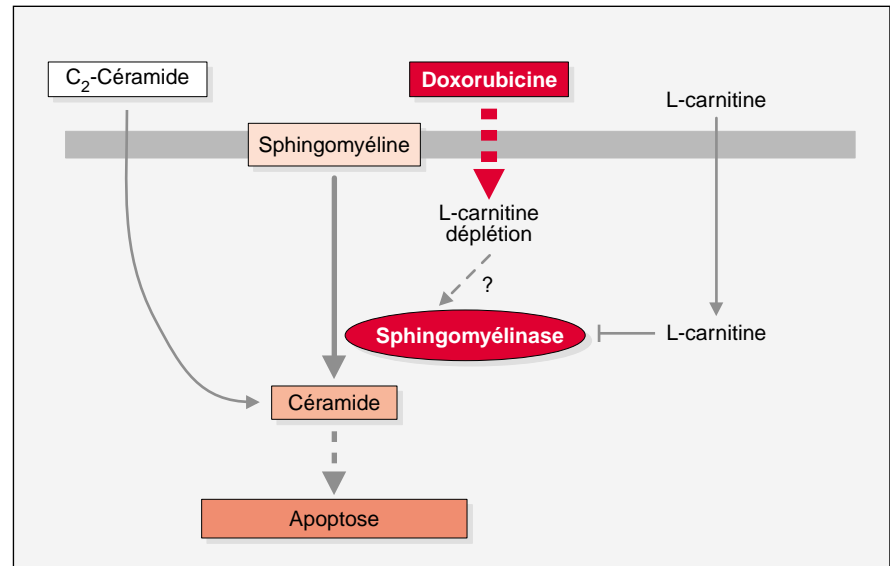
ment des propriétés anti-oxydantes, bloque l'apoptose induite par l'ischémie/reperfusion en inhibant la voie des SAPK (*stress activated protein kinases*) ainsi que l'expression du récepteur Fas [11].

Nous avons récemment montré que la L-carnitine, dont le rôle cardioprotecteur vis-à-vis de l'ischémie et de la cardiotoxicité des anthracyclines est bien connu [12], pouvait bloquer l'apoptose des myocytes cardiaques induite par la doxorubicine (*figure 1*) en inhibant l'activation de la voie sphingomyéline-céramide [8]. En effet, on sait que certains lipides appartenant à la famille des sphingolipides, dont le plus étudié est le céramide, peuvent jouer un rôle de second messager dans la signalisation apoptotique de nombreux types cellulaires stimulés par divers agents cytotoxiques dont le TNF $\alpha$ , Fas et les produits anticancéreux (*m/s 1996, n° 12, p. 1219*). De plus, la voie des sphingolipides peut être activée dans l'apoptose des myocytes cardiaques induite par l'hypoxie/réoxygénation [6] ou par le TNF $\alpha$  [5]. Nous avons observé que l'apoptose induite par la doxorubicine dans les myocytes cardiaques était précédée par une accumulation de céramide (visible dès le troisième jour de culture et maximale au bout de sept jours), une dégradation concomitante de sphingomyéline et une activation de sphingomyélinase, l'enzyme responsable de l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide. Ces trois événements sont inhibés lorsque les myocytes cardiaques sont préincubés avec de la L-carnitine [8].

De plus, l'utilisation de molécules capables de reproduire une accumulation endogène de céramide, a confirmé l'implication de la voie du céramide dans la cardiotoxicité de la doxorubicine. En effet, on induit aussi l'apoptose des myocytes cardiaques en les incubant avec des céramides perméants, capables, grâce au raccourcissement de leur chaîne carbonée, de pénétrer librement à l'intérieur de la cellule, ou avec des composés tels que le D-thréo-1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP), qui inhibent la conversion du céramide en glucosylcéramide.



**Figure 1. Effet de la L-carnitine sur l'apoptose induite par la doxorubicine dans des myocytes cardiaques de rat.** (a) et (d). Myocytes cardiaques de rat en culture. (b) et (e). Myocytes cardiaques de rat en culture traités par 0,5  $\mu$ M de doxorubicine. (c) et (f). Myocytes cardiaques de rat en culture prétraités par 200  $\mu$ g/ml de L-carnitine puis stimulés par 0,5  $\mu$ M de doxorubicine. Les altérations morphologiques nucléaires sont mises en évidence par coloration des cellules à l'éosine/hématoxyline (a, b et c) ou par marquage nucléaire des noyaux au DAPI (d, e et f). (Figure reproduite de [8] avec l'autorisation des auteurs.)



**Figure 2. Schéma hypothétique des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose des myocytes cardiaques induite par la doxorubicine.** La doxorubicine stimule l'activation d'une sphingomyélinase, qui induit une hydrolyse de sphingomyéline et la production concomitante de céramide. La L-carnitine bloque l'apoptose des myocytes cardiaques induite par la doxorubicine en bloquant l'activation de la voie sphingomyéline-céramide.

*In vivo*, des injections chroniques intrapéritonéales de doxorubicine atteignant la dose cumulative de 14 mg/kg à des rats adultes induisent une accumulation de céramide dans le ventricule [7]. Une accumulation

de céramide dans le ventricule avait déjà été observée après la séquence ischémie/reperfusion [6]. L'ensemble de ces résultats indique que la voie du céramide pourrait jouer un rôle important au niveau

cardiaque, en particulier dans la cardiotoxicité de la doxorubicine (figure 2) mais peut-être aussi dans la transmission d'autres signaux. La connaissance précise des différentes cibles intracellulaires impliquées dans la mort des myocytes cardiaques ainsi que des interactions existant entre ces cibles pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques couplées à la chimiothérapie en vue de limiter la toxicité cardiaque des anthracyclines ■

#### Remerciements

Nous remercions le professeur R. Salvayre et le docteur J.P. Jaffrézou pour leurs discussions. N. Andrieu-Abadie remercie l'Association pour la recherche sur le cancer pour son soutien financier.

#### RÉFÉRENCES

- Lock RB, Ross WE. DNA topoisomerase in cancer therapy. *Anticancer Drug Des* 1987; 2: 151-64.
- Olson R, Mushlin P. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J* 1990; 4: 3076-86.
- Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA. Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circ Res* 1999; 84: 257-65.
- Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82: 1111-29.
- Krown KA, Trevor Page M, Nguyen C, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signalling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996; 98: 2854-65.
- Bielawska AE, Shapiro JP, Jiang L, et al. Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am J Pathol* 1997; 151: 1257-63.
- Delpy E, Hatem S, Andrieu-Abadie N, et al. Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 398-407.
- Andrieu-Abadie N, Jaffrézou JP, Hatem S, Laurent G, Levade T, Mercadier JJ. L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. *FASEB J* 1999; 13: 1501-10.
- Li Q, Li B, Wang X, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 1997; 100: 1991-9.
- Wang L, Ma W, Markovich R, Chen JW, Wang PH. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signalling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998; 83: 516-22.
- Yue TL, Ma XL, Wang X, et al. Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ Res* 1998; 82: 166-74.
- Kawasaki N, Lee JD, Shimizu H, Ueda T. Long-term L-carnitine treatment prolongs the survival in rats with adriamycin-induced heart failure. *J Card Fail* 1996; 2: 293-9.

#### Nathalie Andrieu-Abadie

Inserm U. 460, Faculté Xavier-Bichat, 16, rue Henri-Huchard, 75870 Paris Cedex 18, France et Inserm U. 466, CHU Rangueil, 1, avenue Jean-Poulhes, 31403 Cedex 04 Toulouse, France.

#### Thierry Levade

Inserm U. 466, CHU Rangueil, 1, avenue Jean-Poulhes, 31403 Cedex 04 Toulouse, France.

#### Guy Laurent

Inserm E9910, Institut Claudius-Régaud, 20, rue du Pont-Saint-Pierre, 31052 Toulouse Cedex, France.

#### Stéphane Hatem

Inserm U. 460, Faculté Xavier-Bichat, 16, rue Henri-Huchard, 75870 Paris Cedex 18, France

#### Jean-Jacques Mercadier

Inserm U. 460, Faculté Xavier-Bichat, 16, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France.

#### TIRÉS À PART

N. Andrieu-Abadie.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Un ou deux nez?** P. Lledo dans la *synthèse* publiée page 1211 de ce numéro compare les fosses nasales à un merveilleux chromatographe. Mais pourquoi deux fosses nasales? Une communication du dernier numéro de *Nature* nous apprend que cette duplication n'est pas inutile, mais témoigne d'une extrême sophistication. A tout moment, le flux de l'air dans nos deux narines est asymétrique: il s'écoule rapidement dans l'une, plus lentement dans l'autre, en raison d'un œdème discret de la

muqueuse qui fait obstacle à son écoulement. Chaque narine alterne ainsi régulièrement des périodes de flux rapide, puis lent. Le flux de l'air déterminant l'intensité de la perception des odeurs, celle provenant de chaque narine sera différente. Ainsi, les substances odorantes à absorption rapide seront mieux « détectées » par les récepteurs épithéliaux si l'air est brassé rapidement (une plus grande surface d'épithélium sera en contact avec le produit); à l'inverse, la transmission de la perception des

substances à absorption lente sera plus efficace si l'air est brassé lentement. Dieu soit loué, la nature a bien fait les choses, chaque narine pourra apprécier à tour de rôle l'odeur enivrante des freesia...

[1. Sobel N, et al. *Nature* 1999; 402-35.]