Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

2019

Thèse n°

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE (arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement le 22 Novembre 2019 à POITIERS par Mademoiselle BARDIN LAFORGE Alice Née 19 Avril 1994

Mécanisme de toxicité de l'Irinotécan et du 5-Fluorouracile

Composition du jury :

Président : Madame Stéphanie Pain, Maitre de Conférences en Toxicologie

Membres :

Madame Stéphanie Pain, Maitre de Conférences en Toxicologie Monsieur Bernard Fauconneau, Professeur des Universités en Toxicologie Madame Françoise Gilles, Docteur en pharmacie

Directeur de thèse : Monsieur Bernard Fauconneau, Professeur des Universités en Toxicologie

UNIVERSITE DE POITIERS



Professeurs

Faculté de Médecine et de Pharmacie



Année universitaire 2019-2020

PHARMACIE

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
 COUET William, Pharmacie Clinique
 DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
 FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
 - GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
 - IMBERT Christine, Parasitologie
 - > MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
 - > OLIVIER Jean Christophe, Galénique
 - PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
 - > RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
 - RAGOT Stéphanie, Santé Publique
 - SARROUILHE Denis, Physiologie
 - > SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie (HDR)
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- > CHAUZY Alexia, Pharmacologie, pharmacocinétique
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- > DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- ➢ FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- ► PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- ➢ RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- > THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- ➤ THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- > WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

AHU

BINSON Guillaume

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- GUILLAUME Eliot, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier
- GAY Julie

Poste de Doctorant

➢ FREYSSIN Aline

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Bernard Fauconneau d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je vous remercie pour vos conseils lors de mon choix d'orientation pour la toxicologie et pour votre disponibilité lors de la rédaction de ma thèse.

Je remercie Madame Stéphanie Pain, d'avoir accepté la présidence de ce jury. Soyez assurée de ma gratitude.

Je tiens sincèrement à remercier madame Françoise Gilles d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. J'ai commencé ma découverte du métier de pharmacien avec vous il y a maintenant 11 ans et mes études aboutissent aujourd'hui par la présentation de ma thèse en votre présence.

Merci également à Monsieur Abdellah Mansouri et Monsieur Tarik Asselah de m'avoir accueillie au sein de leur équipe de recherche Inserm UMR1149 et de me permettre aujourd'hui de présenter ces résultats.

Merci à ma famille, mes sœurs, et mes parents pour leurs relectures de cette thèse et leur soutien tout au long de mes études.

Merci aux amis Pharmas bien implantés maintenant à Paris, pour tous ces bons moments passés ensemble durant ces années d'études et particulièrement ces dernières années parisiennes !

Merci à Pierre-Alexandre pour ton amour et ton soutien sans faille au quotidien.

Merci à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la rédaction de cette thèse et à l'aboutissement de mes études de pharmacie.

Remerciements	6
Table des illustrations et tableaux	10
Liste des abréviations	12
Introduction générale	14
Introduction	16
I. Irinotécan	16
1) Généralités	16
1) Mécanisme d'action	16
2) Relation structure activité	17
3) Métabolisme	18
4) Pharmacocinétique	19
5) Facteurs pharmacogénétiques associés à la toxicité de l'Irinotécan	20
6) Indications	21
7) Optimisation du traitement	21
8) Effets indésirables extra hépatiques	22
II. 5-Fluorouracile	23
1) Generalites	23
2) Mecanisme d'action	24
3) Nietabolisme et pharmacocinetique	24
4) Indications	26
5) Optimisation des traitements	26
6) Effets indesirables extra hepatiques	27
7) Depistage au deficit en DPD en pratique	27
III. Hepatotoxicite de Frinotecan et de 5-FU	28
1) La mitochondrie	28
1) La millochonarie	28 25
2) ADN Millochondhan (ADNMI)	دد ەر
 Steutoses et steutonepatites : causes et mecanismes La mitachandria : cibla des vánabiatiques bánatataviques 	0C
4) La millochonarie : cible des xenoblociques nepacocoxiques	39
	40
Materiel et methodes	41
1. Produits chimiques	41
II. Animaux et traitements	41
III. Dosage des parametres plasmatiques	41 12
V. Extraction de l'APN bénatique total et analyse de l'expression des gènes d'intérêts par gPCP	42 12
1) Purification des ARN totaux :	42
 2) Synthèse de l'ADNc par Transcription inverse : 	42 ЛЗ
 Synthèse de l'ADNe pui transcription inverse	رب ۱۲
	45
VI Analyse des protéines COX1 MnSOD PGC-1a TFAM HSP70 CLinP et LonP1 par Western bl	 ot <u>4</u> 6
VI. Analyse des proteines coxt, whisob, ride 14, main, his 70, eepin, et com 1 par western bit	48
Resultats	50
5-FO et minotecan augmentent les ALAT et ASAT plasmatiques	50
 III Etude de la fibrose bénatique 	UC
IV Irinotácan ou l'association Irinotácan et 5-EU sont responsables d'une déplétion de l'ADNet	5U
TY. Inforcedation rassociation inforcedation of 5-ro solit responsables a dife depiction de l'ADIVINT	52

V. Irinotécan, 5-FU ou l'association diminuent l'expression de la sous unité 1 de la cytochrome c
oxydase (COX1) codée par l'ADNmt52
VI. Irinotécan, 5-FU ou leur association tendent à diminuer le GSH hépatique et à augmenter les taux
protéiques de MnSOD54
VII. Irinotécan, 5-FU ou leur association augmentent significativement les triglycérides (TG)
plasmatiques
VIII. Effets de 5-FU, Irinotécan ou leur association sur l'expression génique de PPARa, PPARy, SREBP-
1a, SREBP-1c, MCAD et FAS
IX. 5-FU, Irinotécan ou leur association altèrent le processus de mitophagie58
X. Effets du 5-FU, Irinotécan ou leur association sur la biogénèse mitochondriale 58
XI. Etude des effets du 5-FU et de l'Irinotécan sur l'UPR ^{mt} 60
XII. Effets du 5-FU et Irinotécan sur l'expression des Mitofusines 1/2 et DRP1 impliquées,
respectivement dans la fusion et fission mitochondriales60
XIII. 5-FU, Irinotécan ou leur association ne modifient pas l'expression des cytokines
proinflammatoires TNFα et IL6 au niveau hépatique61
Discussion
Conclusion
Bibliographie
Résumé
Abstract

Table des illustrations et tableaux

Figure 1 : Structure chimique de l'Irinotécan16
Figure 2 : Mécanisme d'action de l'Irinotécan.)17
Figure 3 : Forme lactone et forme carboxylate de l'Irinotécan
Figure 4 : Métabolisme de l'Irinotécan 19
Figure 5 : Mutations de l'UGT1A1 21
Figure 6 : Structure chimique du 5-Fluorouracile 23
Figure 7 : Structures chimiques de l'uracile, de la thymine et du 5-FU
Figure 8 : Schéma simplifié du métabolisme du 5-FU 25
Figure 9 : Structure schématique d'une mitochondrie 29
Figure 10 : Schéma simplifié des principales fonctions mitochondriales et le stress oxydant associé
Figure 11 : Organisation schématique de l'ADN mitochondrial 35
Figure 12 : Coupes histologiques de foies atteints d'une stéatose
Figure 13 : Concentrations plasmatiques des transaminases
Figure 14 : Histologie hépatique après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine
Figure 15 : Coupes de foie observées en microscopie optique après coloration au rouge sirius
Figure 16 : Observation par immunohistochimie d'αSMA51
Figure 17 : Quantification de l'ADNmt
Figure 18 : Conséquence de la diminution de l'ADNmt sur l'expression de la Cytochrome c oxydase 1 51
Figure 19 : Evaluation du stress oxydant mitochondrial et hépatique
Figure 20 : Dosage des triglycérides en mmol/L dans les différents groupes
Figure 21 : Expression relative des ARNm des facteurs de transcription et enzymes impliquées dans la β-
oxydation55
Figure 22 : Expression relative des ARNm des enzymes impliquées dans la synthèse De novo des acides gras
Figure 23 : Impact du 5-FU et de l'Irinotecan sur la mitophagie
Figure 24 : Effets du 5-FU et de l'Irinotécan sur l'expression de PGC1α.
Figure 25: Effets du 5-FU et de l'Irinotécan sur l'expression du facteur de transcription mitochondrial TFAM
Figure 26. Expression relative des ARNm et expression des protéines chaperonnes impliquées dans l'UPR ^{mt} .
Figure 27 : Expression relative des ARNm des protéases par qPCR
Figure 28 : Expression relative des ARNm et expression des protéines impliquées dans la fusion et la fission des
mitochondries par qPCR
Figure 29 : Effets du 5-FU, de l'Irinotécan ou de l'association sur l'inflammation

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées en qPCR	44
Tableau 2 : Programme de qPCR	45
Tableau 3: Listes des anticorps utilisés lors des Western Blot	47

Liste des abréviations

5-FU	5-Fluorouracile
a SMA	α Smooth Muscle Actin
ADNmt	ADN mitochondrial
ADNn	ADN nucléaire
ADP	Adénosine Di-Phosphate
AG	Acides gras
ALAT	Alanine aminotransférase
ATFS1	Activating transcription factor associated with stress 1
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
ARNm	Acide Ribonucleique messager
ASAT	Aspartate aminotransferase
BM	Biogenèse Mitochondriale
BSA	Bovine Serum Albumine
BCL-2	B-cell Lymphome 2
CLpP	Caseinolytic Proteolytic Protease (mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit)
COX 1	Cytochrome <i>c</i> oxidase I
CPT-1	Carnitine Palmitoyltransférase I
CPT-11	7-ethyl-10-4-(1-piperidino)-1-piperidinocarbonyloxycamptothecin ou Camptothecin-11 (Irinotécan)
CR	Chaîne respiratoire
DPD	DihydroPyrimidine Déshydrogénase
DRP1	Dynamin related protein 1
dTMP/dTTP	DésoxyThymidineMonoPhoisphate ou TriPhosphate
ERK	Extracellular regulated signalling
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FADH	Flavine Adénine dinucleotide
FAS	Fatty Acid Synthase
gGT	γ Glutamyl transferase
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HSP60/70	Heat shock Protein 60/70
LC3 I II	Light chain 3

LonP1	Lon peptidase 1
MCAD	Medium Chain Acyl Coenzyma A Dehyddrogenase
MFN1/2	Mitofusine 1 / 2
MnSOD	Superoxyde Dismutase à Manganèse (MnSOD)
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NRF1/2	Nuclear Respiratory Factor1/2
02•-	Anion Superoxyde
OH°	Radical hydroxyl
OPA 1	Optic Atrophic Protein
Parkin	Parkinson juvenile disease protein 2 (E3 ubiquitin ligase Parkin)
PGC1a	Peroxisome proliferator-activated receptor y Coactivator-1alpha
PINK1	Phosphatase and Tensin-Induced Putative Kinase-1
PPAR α	Peroxisome Proliferator Activator Receptor α
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaine)
SREBP-1a/1c	Sterol regulatory element-binding protein 1a / 1c
Tfam	Facteur de transcription mitochondrial
TGF-β	Transforming growth factor β
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TG	Triglycérides
UGTs	Uridinediphosphate Glucurosyltransférase
UPRmt	Unfolded Protein Response Mitochondrial
UPS	Ubiquitin proteasome system
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WB	Western Blot

Introduction générale

Plus d'un million de personnes sont diagnostiquées d'un cancer colorectal chaque année dans le monde, et plus de 6% en décèdent. L'incidence la plus forte est retrouvée dans les pays développés, en Europe, en Amérique du nord et en Océanie avec 60 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants alors qu'elle est plus faible en Afrique ou en Asie centrale avec 5 nouveaux cas pour 100 000 hommes (Brenner et al., 2014). En France, le cancer colorectal occupe, en terme d'incidence, la 4_{ème} place en 2018, avec 30 nouveaux cas pour 100 000 habitants et une incidence plus importante chez les hommes que chez les femmes (Ferlay et al., 2019). Si la chirurgie constitue le traitement de base du cancer colorectal, parfois seule la chimiothérapie par l'Irinotécan et le 5-Fluorouracile (5-FU) (soit individuellement ou en association) peut être indiquée selon le stade de la maladie. C'est le cas pour les cancers du colons de grade III et métastasiques (Sandhu et al., 2019).

L'efficacité de cette association d'anticancéreux a été démontrée dans des modèles *in vitro* et *in vivo* par plusieurs équipes de recherche dans les années 90 (Eder et al., 1998; Guichard et al., 1998). Cependant, la chimiothérapie à base de 5-FU et d'Irinotécan a de nombreux effets secondaires graves hématologiques (neutropénie, thrombopénie ou anémie) (Van Cutsem et al., 2009), digestifs (Huisman et al., 2016), ou hépatiques avec un développement de stéatoses (Fernandez et al., 2005; Mahli et al., 2017) pouvant évoluer en stéatohépatite, en fibrose et parfois en cirrhose (Fernandez et al., 2005; Mahli et al., 2017; Mansouri et al., 2018; Vauthey et al., 2006; Zorzi et al., 2007). Le développement de la stéatohépatite chez des patients traités par 5-FU ou Irinotécan impose non seulement l'arrêt de cette chimiothérapie mais constitue aussi une contre-indication sérieuse à l'ablation chirurgicale du cancer du côlon, compromettant ainsi tout espoir de guérison. Mieux comprendre les mécanismes précis de l'hépatotoxicité du 5-FU et de l'Irinotécan permettrait ainsi de proposer des mesures préventives de l'apparition de lésions hépatiques chez les patients traités.

Il est à noter que les principaux mécanismes de développement des stéatoses et stéatohépatites sont des altérations du métabolisme lipidique liées à des dysfonctions mitochondriales ([CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la mitochondrie avait un rôle majeur dans l'hépatotoxicité induite par l'irinotécan ou le 5-FU sans pour autant en déterminer le mécanisme exact (Sawano et al., 2015; Sommer et al.; Vauthey et al., 2006). De plus,

plusieurs travaux réalisés dans mon laboratoire d'accueil INSERM U1149 ont montré que les mitochondries constituaient des cibles fréquentes, jusqu'ici méconnues, de l'hépatotoxicité des médicaments (Larosche et al., 2007; Mansouri et al., 2018; Pessayre et al., 2012).

Ainsi, le principal but de ce travail a été de rechercher des effets toxiques du 5-FU et/ou de l'Irinotécan au niveau mitochondrial et d'expliquer les mécanismes par lesquels ces anticancéreux pourraient entraîner une stéatose hépatique. Par la suite, des mesures préventives pourront être proposées. Pour cela, j'ai étudié les effets du 5-FU et de l'Irinotécan par l'ADN mitochondrial, la fonction mitochondriale, la dynamique mitochondriale ainsi que les atteintes histologiques et l'inflammation hépatique.

Avant d'aborder ce sujet, et pour mieux comprendre notre étude, il parait important de présenter les deux médicaments étudiés puis de rappeler les principales fonctions mitochondriales, le génome mitochondrial, la physiopathologie des stéatoses et stéatohépatites ainsi que l'hépatotoxicité de l'Irinotécan et du 5-FU.

Introduction

L'Irinotécan et le 5-Fluorouracile sont deux anti-cancéreux utilisés en association dans le traitement des cancers colorectaux. L'Irinotécan est un inhibiteur de la topoisomérase I et le 5-FU est un antimétabolite antipyrimidique.

- I. Irinotécan
- 1) Généralités



Figure 1 : Structure chimique de l'Irinotécan.

Découverte en 1966 par Wall et al, la camptothécine est une molécule obtenue à partir de l'écorce de *Camptotheca acuminata*, un arbre du Japon (Wall et al., 1966). *In vitro*, il a été montré que la camptothécine inhibait la synthèse des acides nucléiques mais qu'elle était aussi très toxique pour l'homme, c'est pourquoi elle a été abandonnée pendant de longues années. Cependant, la camptothécine présente des propriétés cytotoxiques intéressantes, avec un mode d'action original : l'inhibition de la reliaision des brins de l'ADN par la topoisomérase I. Après la découverte de ce mode d'action, les recherches et le développement de cette molécule ont repris et afin de réduire la toxicité, des dérivés hémi-synthétiques, comme l'irinotécan et le topotécan (Sparreboom et al., 1998), ont été synthétisés. L'Irinotécan ou CPT-11 (Camptho ®) a été synthétisé par Yokokura en 1981 (Yokokura et al., 1981). Il est aujourd'hui utilisé dans le traitement des cancers génitaux féminins, des bronches et du colon (Vanhoefer et al., 2001).

1) Mécanisme d'action

L'Irinotécan est un inhibiteur de la topoisomérase I. Cette enzyme permet une relaxation de l'ADN superenroulé en induisant une coupure simple brin lors de la réplication ou de la transcription. Puis, lorsque l'ADN a été transcrit ou répliqué, la topoisomérase I ressoude cette brèche via son activité ligase. L'Irinotécan empêche

cette dernière étape (Rougier and Lepère, 2005). Ainsi, en inhibant les topoisomérases mitochondriales, l'Irinotécan pourrait altérer la réplication de l'ADN mitochondrial.



Figure 2 : Mécanisme d'action de l'Irinotécan. La topoisomérase I permet la rotation contrôlée de l'ADN et sa religation lors de la transcription. L'Irinotécan, par inhibition de cette enzyme va bloquer la religation et par conséquent la transcription entrainant la mort cellulaire. (Pommier, 2006)

2) Relation structure activité

La camptothécine et ses dérivées sont constitué d'une structure pentacyclique présentant un groupe α -hydroxy- δ -lactone (Nabiev et al., 1998) (Figure 3). Ce cycle lactone est primordial pour l'activité antitumorale *in vivo* car il permet l'entrée dans la cellule et son interaction avec la topoisomérase I (Hertzberg et al., 1989).

L'ouverture du cycle lactone, responsable de l'activité de l'Irinotécan, est pH dépendant. Dans les conditions physiologiques du sérum humain à pH 7,4 et 37°C, le cycle lactone s'hydrolyse rapidement et complétement en carboxylate, ce qui le rend inactif du fait de son manque d'affinité avec la topoisomérase et son groupement carboxylate. Cependant, ce mécanisme est retardé car le cycle lactone, très hydrophobe, se loge dans la membrane cellulaire.



Figure 3 : Forme lactone et forme carboxylate de l'Irinotécan. La forme lactone (cycle E) de l'Irinotécan est la forme active et peut être hydrolysée en carboxylate, la forme inactive.

3) Métabolisme

Lors de son métabolisme (Figure 4), l'Irinotécan ou CPT- 11 (7-ethyl-10-4(-1pipéridino)-1-pipéridino)-carboxylcoxycamptothecine) peut suivre 2 voies : l'anabolisme et le catabolisme.

Lors de l'anabolisme, l'Irinotécan, pro-drogue, est tout d'abord clivé par les carboxylestérases 1 et 2 (CE1 et CE2) en un métabolite actif : le SN38 (7-ethyl-1-hydroxycamptothecine) possédant une activité anti tumorale mille fois supérieure au substrat initial (Kawato et al., 1991). Le CPT-11, est majoritairement hydrolysé par la CE2, dans le foie et le tractus digestifs, lieu d'expression de ces enzymes (Wu et al., 2002; Xu et al., 2002).

Lors du catabolisme au niveau hépatique, l'Irinotécan est soumis à la détoxification par les cytochromes P450 3A4. Cette voie consiste en l'oxydation du groupe terminal du CPT-11 par le cytochrome P450 3A4 qui conduit à la formation de 2 composés peu actifs : APC (7-éthyl-10-[4-N-(5-aminopentanoicacid)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecine) et NPC (7-ethyl-10-[4-N-(1-piperidino)-1-amino]-carbonyloxycamptothecine) (Santos et al., 2000; Sparreboom et al., 1998).

La détoxification du SN38 se fait par glucuronidation par l'urinidine diphosphate glucurosyltransférase 1A1 (UGT1A1), afin d'obtenir un dérivé inactif β -glucuronide, le SN38G (Boyer et al., 2014). La glucuronidation, réversible grâce à la présence de β – glucuronidase au niveau de la flore intestinale, se fait majoritairement dans les hépatocytes. Le SN38G est ensuite excrété par des transporteurs dans le canal biliaire pour rejoindre, via la bile, la lumière intestinale.



Figure 4 : Métabolisme de l'Irinotécan. Dans l'hépatocyte, l'Irinotécan est métabolisé par les carboxyestérases 1 et 2 en SN-38, le composé actif. Celui-ci est détoxifié par glucuronidation par les UGTs en SN-38G inactif et non toxique. Le SN-38 peut également est pris en charge par la bile est être métabolisé en SN-38G dans l'intestin par les UGTs. L'Irinotécan est également métabolisé par le cytochrome P450 3A4 en deux composés peu actifs l'APC et le NPC.

4) Pharmacocinétique

Le taux plasmatique d'Irinotécan, lorsqu'il est injecté en perfusion, décroit de façon exponentielle. Cependant, la concentration en SN-38 varient d'avantage, en fonction des individus et des protocoles, s'échelonnant entre 1h et 1h30 après la fin de la perfusion. Chez les patients ayant une insuffisance hépatique, l'administration de doses initiales plus faibles est nécessaire Monographie de l'Irinotécan Pfizer 2019

La liaison aux protéines plasmatiques, majoritairement l'albumine, de l'Irinotécan est comprise en 30 et 68% contre 98% pour le SN38 (Chabot et al., 1998).

Le SN 38, d'une demi-vie de 13,8 heures est éliminé par excrétion biliaire et rénale. Le SN38G, présent à plus forte dose dans le plasma que le SN38, est éliminé de la même façon. Seule une petite fraction de l'Irinotécan et de ces métabolites sont éliminés dans les urines et une plus grande proportion par la bile par le cycle entérohépatique. Des relations ont été mises en évidence entre la concentration de l'Irinotécan et du SN38 et la toxicité hématologique et intestinale, suggérant un potentiel de surveillance de ce médicament (Chabot et al., 1998; Robert and Rivory, 1998).

5) Facteurs pharmacogénétiques associés à la toxicité de l'Irinotécan

Les voies métaboliques sont soumises à une variabilité génétique ou environnemental qui peuvent interférer avec l'activité et la tolérance de l'Irinotécan chez les patients. Il a été montré qu'une réduction de la glucuronidation par l'urinidine diphosphate glucurosyltransférase (UGTs) du SN38 peut être associée à une augmentation de la toxicité pouvant entrainer l'arrêt du traitement (Gupta et al., 1994). De plus, il existe un polymorphisme important des UGTs dans la population générale pouvant entrainer des toxicités plus ou moins importantes selon les variants.

Les UGTs, classés en 4 familles (UGT1, UGT2, UGT3 et UGT8), permettent le transfert d'un groupement glucuronide provenant du cofacteur, l'acide UDP glucuronique, sur différentes molécules endogènes ou exogènes possédant un groupement carboxyle, hydroxyle ou amine. Les molécules modifiées deviennent généralement inactives, hydrosolubles et ont une plus faible toxicité. Ces transformations réversibles concernent notamment la bilirubine, les sels biliaires, les stéroïdes et certains médicaments (Dong et al., 2012).

En 1998, *Iyer* et al démontre que l'UGT1A1 est responsable de la glucuronidation du SN38 (Iyer et al., 1998) et que des mutations géniques peuvent entrainer une toxicité sévère chez les patients traités (Ando et al., 1998; Wasserman et al., 1997). Par exemple, la mutation UGT1A1*28 (homozygotes TA7) correspond à l'insertion d'un couple TA au niveau de la région (TA)6TAA du promoteur du gène UGT1A1*1 (Iyer et al., 2002).



Figure 5 : Mutations de l'UGT1A1. L'Urinidine diphosphate Glucurosyltransférase 1A1 présente différents polymorphismes correspondant à différentes mutations. Les mutations peuvent avoir lieu au niveau de l'Exon 1 et correspondent à une insertion ou une délétion du couple TA au niveau de la région (TA)6TAA ou au niveau du codon 71 ou 229 et correspondent à un changement de base nucléotidique.

Dans la population caucasienne, 50% sont homozygotes TA6, 40% hétérozygotes TA6/TA7 et 10% sont homozygotes TA7 (O'Dwyer and Catalano, 2006). Cette mutation entraine une diminution de 30% de l'activité enzymatique ce qui entraine une augmentation de la toxicité (neutropénie et diarrhée) (Ando et al., 1998; Toshimoto et al., 2017; Wasserman et al., 1997) obligeant une adaptation individuelle des doses administrées.

6) Indications

En monothérapie, l'Irinotécan est recommandé dans le traitement du cancer colorectal à 350 mg/m² administrés en perfusion intraveineuse de 30 à 90 minutes toutes les 3 semaines après un échec de traitement contenant du 5-FU. Pour augmenter l'efficacité, l'Irinotécan est souvent associé à d'autres molécules comme le 5-Fluorouracile et l'acide folinique (FOLFIRI), la capécitabine (CAPIRI) ou encore des anticorps monoclonaux.

7) Optimisation du traitement

Il existe plusieurs protocoles de chimiothérapie comme le protocole FOLFIRI associant le 5-FU et l'acide folinique, en première ligne du traitement du cancer colorectal à un stade avancé.

L'irinotécan peut être associé à une thérapie ciblée anti-EGFR avec le Cétuximab dans le cas d'un cancer colorectal métastatique et avec expression du récepteur de facteur de croissance EGFR chez les patients (Cunningham et al., 2004), ou à une thérapie ciblée anti-angiogénique, avec le bévacizumab, dans le traitement de première intention chez les patients présentant un carcinome métastatique du colon et rectum (Boyer et al., 2014; Hurwitz et al., 2004). Ces associations de médicaments ont montré leur efficacité dans le traitement du cancer colorectal comparés à l'irinotécan seul. Le protocole associant le Bévacizumab, 5-FU, l'acide folinique, l'oxaliplatine, et l'Irinotécan a montré une efficacité et une meilleur tolérance comparé à l'association 5-FU, acide folinique et Irinotécan (Cremolini et al., 2015).

Associé à la capécitabine et au bévacizumab, l'Irinotécan est recommandé en traitement de première ligne du cancer du colorectal métastatique (Schmiegel et al., 2013).

8) Effets indésirables extra hépatiques

Malgré ses effets bénéfiques contre les cellules cancéreuses, l'Irinotécan présente des effets indésirables importants au niveau intestinal et hématologique. Lors des études cliniques il a été observé des diarrhées aiguës ou tardives et des leucopénies ou granuclocytopénies fréquentes suite à l'injection d'Irinotécan (Masuda et al., 1996).

Environ 10% des patients traités par Irinotécan développe des troubles intestinaux. Ces troubles incluent diarrhée, saignement, nausées, vomissements, douleurs abdominales et peuvent avoir un impact négatif sur la qualité de vie et l'observance du traitement. L'agence américaine l'Institut National de la Santé (National Institute of Health) a standardisé des critères cliniques afin d'évalué la sévérité des troubles gastro-intestinaux (Grade 1 à 5) (Ribeiro et al., 2016). Plusieurs études ont montré que le polymorphisme UGT1A1*6 et *28 augmentaient le risque de diarrhée induite par l'Irinotécan (Campbell et al., 2017). Lors d'un traitement par Irinotécan, la diarrhée peut survenir de façon aigue ou à retardement. En aigue, elle est liée à l'activation de la voie parasympathique entrainant un syndrome cholinergique contrôlé par l'atropine (Dodds and Rivory, 1999). La forme retardée des diarrhées est plus compliquée à démontrer. Il a été suggéré qu'elle était dû à un changement d'absorption des fluides et des électrolytes, à un disfonctionnement du tonus intestinal et d'une inflammation caractérisant le développement d'une mucosite.

La neutropénie est également une toxicité induite par l'Irinotécan. Des études ont démontrés que le polymorphisme UGT1A1*6 et UGT1A1 *28 était un facteur de risque notamment dans les populations asiatiques mais aussi caucasiennes (Campbell et al., 2017; Liu et al., 2014).

II. 5-Fluorouracile

1) Généralités



Figure 6 : Structure chimique du 5-Fluorouracile.

En 1957, Heidelberger synthétise le 5-FU à partir de l'atome de fluor et des bases pyrimidiques de l'ADN. Il remarque que le fluor peut bloquer une enzyme vitale au métabolisme cellulaire : la thymidilate synthase. A partir de cette découverte, il réalisa plusieurs expériences sur les rongeurs afin de déterminer l'activité sur certains tissus tumoraux. Ce premier rapport montre une activité biologique anti tumorale intéressante des pyrimidines fluorées et déterminera une nouvelle classe d'anti cancéreux : les anti métabolites (Heidelberger et al., 1957).

La famille des fluoropyrimidines, analogues des bases pyrimidiques, sont représentées par le 5-FU, la capécitabine et l'UFT (tégafur-uracile) et sont utilisés dans le traitement des cancers colorectaux, de l'œsophage ou de l'estomac (Boisdron-Celle et al., 2010). Le 5-FU est une pyrimidine fluorée dont la structure chimique est voisine de celle de la thymine et surtout de l'uracile avec atome de fluor à la place du groupement méthyle ou de l'hydrogène (Figure 7).



Figure 7 : Structures chimiques de l'uracile, de la thymine et du 5-FU.

La connaissance du métabolisme du 5-FU a permis d'établir l'index thérapeutique, de déterminer la potentielle réponse au traitement et d'expliquer la toxicité.

2) Mécanisme d'action

L'uracile joue un double rôle lors de la division cellulaire : c'est un précurseur de la thymine via la thymidilate-synthase. Le 5-FU est un inhibiteur spécifique de la thymidilate synthase. Elle est l'unique enzyme cellulaire à transformer l'uracile en thymidine qui sera ensuite incorporée dans l'ADN (Paule and Brion, 2000). Le métabolisme du 5-FU implique une réduction en 5-fluorodéoxyuridine 5'-monophosphate (FdUMP) qui se lie à la thymidilate-synthase, et bloque la méthylation de l'uracile en thymine et donc la synthèse d'ADN.

3) Métabolisme et pharmacocinétique

Métabolisme

L'uracile, précurseur d'une base d'ADN, et le 5-FU pénètrent dans la cellule par un processus saturable. Une fois en intracellulaire, le 5-FU peut suivre 2 voies : l'anabolisme et le catabolisme. L'anabolisme représente 10 à 40% du métabolisme contre 60 à 90% pour le catabolisme. Lors de l'anabolisme, le 5-FU est métabolisé en métabolite actif phosphaté, le 5-FdUMP (5-fluorodéoxyuridine 5'-monophosphate) grâce à l'action de la thymidine kinase. Le 5-FdUMP inhibe ensuite la thymidilate synthase nécessaire à la synthèse correcte d'ADN. Une autre voie anabolique possible est la phosphorylation du 5-FU en triphosphate (FUTP) incorporé ensuite à la place de l'uracile dans les ARNs (messagers, transferts) entrainant une erreur de maturation. La dernière voie est l'incorporation de 5-FdUTP (5-Fluorodésoxytriphosphate) dans l'ADN provoquant sa fragmentation.

Le catabolisme du 5-FU met en jeu la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), présente en quantité variable dans de nombreux tissus comme le foie ou les tissus de l'appareil digestif. Dans la plupart des tissus, le catabolisme du 5-FU s'arrête à la formation du 5-FUH₂ par la DPD. Cependant, dans le foie, le 5-FUH₂ est catabolisé en 5-fluorouréidopropionique (5-FUPA) puis en α -fluoro β -alanine (FBAL) et urée. Le FBAL converti en fluoroacétate, peut être responsable de cardiotoxicité et neurotoxicité par le blocage du cycle de Krebs (Aparicio et al., 2008; Koenig and Patel, 1970).



Figure 8 : Schéma simplifié du métabolisme du 5-FU. Une fois absorbée le 5-Fu peut suivre 2 voies : le catabolisme et l'anabolisme. Le catabolisme, voie majoritaire, entraine la formation du 5-FUH₂ par la DihydroPyrimidine Déshydrogénase (DPD). Au niveau des hépatocytes cette molécule peut etre transformée en 5-FUPA et FBAL + urée par la Dihydropyrimidase et l'uréidopropionase. La voie anabolique permet la formation du 5-FdUMP par la Thymidine kinase qui va inhiber la Thymidilate synthase et ainsi bloquer la réplication de l'ADN.

Absorption

Par voie orale, le 5-FU a une faible biodisponibilité et très variable, la répartition de la DPD étant variable au niveau tissulaire, la biodisponibilité orale du 5-FU varie elle aussi de façon importante de 0 à 80%.

L'administration se fait le plus souvent par voie parentérale lors de chimiothérapie, sa clairance est de 0,9 à 1,9L/min et son volume de distribution est de 14 à 54 L (Diasio and Harris, 1989). Le 5-FU est alors rapidement distribué de façon sélective aux tissus à croissances rapides comme les tumeurs, ce qui lui confère une demi-vie très courte d'environ de 8 à 22 minutes (Aparicio et al., 2008).

En perfusion continue, la clairance est plus élevée et peut atteindre 7 L/min. Il existe une variation de la concentration en 5-FU dû à l'activité de la DPD qui suit une activité circadienne (pic d'activité entre 22h et 4h) (Harris et al., 1988). De plus, il existe également une variabilité interindividuelle de l'activité de la DPD qui suit une courbe

de Gauss. Ces variations suggèrent fortement une adaptation individuelle des doses et du schéma d'administration (Aparicio et al., 2008).

4) Indications

Le 5-FU est indiqué dans le traitement de plusieurs cancers comme les adénocarcinomes digestifs évolués, cancers colorectaux après résection en situation adjuvante, adénocarcinomes mammaires après traitement locorégional ou lors des rechutes, adénocarcinomes ovariens, carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures et œsophagiennes.

5) Optimisation des traitements

Le 5-FU est utilisé seul ou en association dans le traitement de cancers notamment digestifs : colon, pancréas, estomac. Le taux de réponse peut être amélioré en l'associant à d'autres molécules comme l'acide folinique ou d'autres agents cytotoxiques comme le cisplatine.

L'acide folinique, après être réduit en MTHF (5-méthyltétrahydrofolate) par l'organisme, stabilise le complexe FdUMP-Thymidilate synthase prolongeant ainsi l'inhibition de l'enzyme. Dans le cancer du côlon métastatique, l'association avec l'acide folinique permet d'avoir une meilleure réponse du traitement que lorsque le 5-FU est administré seul (Gramont et al., 1988).

Le cisplatine peut également être associé au 5-FU afin de potentialiser son effet sur l'ADN. En effet, en plus d'altérer l'ADN de par sa propre activité, il augmente également la quantité de folate qui stabilise le complexe FdUMP-Thymidilate synthase. Cependant, cette association n'a pas montré de gain de survie dans le cas du cancer colorectal, c'est pourquoi il a vite été abandonné. Il est malgré tout utilisé dans le traitement d'autres cancers digestifs comme l'estomac ou le pancréas.

Afin de rendre le traitement plus facile pour les patients, une voie pro-drogue par voie orale a été développé : la capécitabine. Une étude de 2001 compare la voie orale (Capécitabine) avec la voie IV du 5-FU + leucovorine. Il en résulte une meilleure efficacité avec la prodrogue, taux de réponse de 24% vs 15% et une amélioration de la tolérance avec une diminution signification des effets indésirables (Hoff et al., 2001). Malgré les effets cardiotoxiques relevés (Van Cutsem et al., 2002), la capécitabine obtient l'accord de la FDA dans le cadre du traitement du cancer du côlon stade III chez les patients ayant eu une première résection tumorale (Layoun et al., 2016).

6) Effets indésirables extra hépatiques

Que ce soit la forme orale, capécitabine, ou la forme 5-FU intraveineux, une toxicité sévère est retrouvée chez 10 à 40% des patients selon les protocoles et une toxicité létale chez 0,2 à 0,8 % des patients (Loriot et al., 2018). Le lien entre le déficit en DPD et la gravité des effets a été démontré dans de nombreux travaux. En effet, un déficit en DPD entraine une diminution de la dégradation du 5-FU ce qui entraine un fort surdosage et une toxicité importante au niveau hématologique et digestif. Aujourd'hui, la recherche de ce déficit est obligatoire avant tout traitement par capécitabine ou 5-FU

Cet anti-cancéreux présente une toxicité gastro-intestinale lié à une accélération du transit associé à une inflammation transitoire pouvant survenir quelque jour après le début du traitement (McQuade et al., 2016). La cardiotoxicité est également à noter lors d'un traitement par le 5-FU (Layoun et al., 2016). Plusieurs mécanismes ont été mis en évidence depuis les années 90. Il a été montré en 1993, que le 5-FU entraine une vasoconstriction du myocarde et la libération de la protéine kinase C, médiateur du tonus musculaire, conduisant à des vasospasmes (Mosseri et al., 1993). En 2012, Jenssen et al, démontrent un effet toxique direct sur le tissu coronarien entrainant un effet pro-coagulant du 5-FU (Jensen and Sørensen, 2012). Une autre possibilité induisant un cardiotoxicité est le FBAL, issus du métabolisme ; celui-ci peut également être responsable par l'inhibition du cycle de Krebs (Lemaire et al., 1992).

7) Dépistage du déficit en DPD en pratique

Les déficits complets en DPD sont relativement rares (0,1 à 0,5% dans la population générale) alors que les déficits partiels représentant 3 à 15% des patients selon les études (Etienne et al., 1994; Launay et al., 2017). Il existe deux façons de détecter ce déficit : par phénotypage, en mesurant l'activité enzymatique, ou par génotypage, en recherchant les polymorphismes fonctionnels du gène concerné.

Le phénotypage est basé sur différentes approches fonctionnelles de la DPD : dosage de l'activité enzymatique dans les cellules sanguines mononuclées (Etienne et al., 1994), dosage du rapport dihydrouracile/uracile (UH2/U) physiologique dans le plasma, urine ou salive directement ou après ingestion d'une dose test d'uracile (Boisdron-Celle et al., 2007; Staveren et al., 2016), dosage de l'uracile plasmatique (Meulendijks et al., 2017). En France, la méthode la plus utilisée est la mesure du rapport UH2/U plasmatique en raison de sa simplicité et de sa sensibilité (82%) ; le

dosage de l'uracilémie est également réalisé et a une sensibilité de 88%. Dans une étude française de 205 patientes atteintes de cancer du sein, une uracilémie supérieure à 16ng/ml entrainait un risque de développer une toxicité de grade 4 avec un risque relatif de 20,6 par rapports aux patients présentant un dosage inférieur à 16ng/ml (Etienne-Grimaldi et al., 2017).

Le génotypage a permis de déterminer 4 variants délétères associés aux toxicités sévères voire létales : *2A, le plus étudié, *13, p.D949V et l'haplotype B3 (HapB3). 10 à 17% des patients présentant une toxicité précoce sont porteurs d'un des trois variants suivants : *2A, *13 et p.D949V. Au total, environ 6 à 8% des patients sont porteurs d'un de ces variants expliquant 25% des toxicités sévères précoces observés (Etienne et al., 1994; Etienne-Grimaldi et al., 2017; Launay et al., 2017).

III. Hépatotoxicité de l'Irinotécan et de 5-FU

Plusieurs études ont montré dans de grandes cohortes de patients que l'Irinotécan et le 5-Fluorouracile provoquaient des atteintes hépatiques variées et en particulier des stéatohépatites médicamenteuses (Costa et al., 2014; Fernandez et al., 2005; Mahli et al., 2017; Vauthey et al., 2006; Zorzi et al., 2007). Cependant, le mécanisme des stéatohépatites induites par ces deux médicaments reste méconnu.

- IV. La mitochondrie
 - 1) La mitochondrie

Structure et origine

Les mitochondries sont des organites du cytoplasme, mesurant entre 1 à 2 μ m de long et 0,5 à 1 μ m de large, retrouvées dans toutes les cellules de l'organisme à l'exception des globules rouges. La mitochondrie est constituée de deux membranes, interne et externe, formées de deux bicouches phospholipidiques. Ces deux membranes sont séparées par un espace inter-membranaire et la membrane interne forme de nombreux replis délimitant la matrice mitochondriale (Figure 9) (Burke, 2017) Il a été proposé que les mitochondries aient une origine bactérienne (Yang et al., 1985). Cet organite proviendrait de l'incorporation d'une bactérie dans une cellule eucaryote primitive il y a environ 1.5 milliard d'années. Cette origine bactérienne résulterait d'une endosymbiose entre une bactérie ancestrale, l'α-protéobactérie, vivant en aérobie et un micro-organisme vivant en anaérobie. Au cours de l'évolution, la plupart des gènes de la protéobactérie auraient migré dans le noyau de l'hôte. Cependant, l'existence de protéines mitochondriales très hydrophobes et difficilement importables du cytoplasme vers la mitochondrie aurait contrainte celle-ci à conserver un génome semi-autonome (Claros et al., 1995). Ainsi chaque mitochondrie possède plusieurs exemplaires de son propre génome, dont la réplication et l'expression sont contrôlées par des protéines codées par le génome nucléaire.



Figure 9 : Structure schématique d'une mitochondrie. La mitochondrie est composée d'une membrane interne et d'une membrane externe renfermant la chaine respiratoire. La matrice mitochondriale est délimitée par les replis de la membrane interne.

Principales fonctions mitochondriales

Le premier rôle décrit de la mitochondrie est sa fonction de production d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate). En fonction de l'activité métabolique et de la demande énergétique du tissus, le nombre de mitochondries varie : il est très important dans les muscles, le cœur, le cerveau et le foie (Conley, 1994).

d'ATP est le résultat La production final de plusieurs réactions métaboliques interdépendantes (Mansouri et al., 2018). Le pyruvate issu de la dégradation du glucose par glycolyse est converti en Acétyl-CoA au niveau mitochondrial. La β-oxydation mitochondriale des acides gras (AG) conduit à la formation d'Acétyl-CoA (Burke, 2017). Quel que soit son origine, celui-ci est ensuite complétement oxydé en CO₂ par le cycle de Krebs (Figure 10). L'ensemble de ces réactions s'accompagne de la formation de coenzymes réduits NADH et FADH2. Ces derniers donnent leurs électrons à la chaîne respiratoire et sont ainsi réoxydés lors de la phosphorylation oxydative fournissant l'ATP. Les cofacteurs oxydés (NAD+ et FADH) sont réutilisés par les enzymes de la β-oxydation des AG. C'est ainsi que la chaîne respiratoire régule et contrôle étroitement l'oxydation des AG et inversement (Figure 10). Par conséquent, toute altération de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire pourrait secondairement inhiber la β-oxydation mitochondriale des AG (Mansouri et al., 2018).

Le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire est associé à une expulsion des protons H₊ de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, créant un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane interne (Figure 10). L'énergie emmagasinée par ce gradient est dissipée sous forme d'énergie permettant la synthèse d'ATP lors de la réentrée de ces protons dans la matrice mitochondriale à travers l'ATP synthase (ou complexe V) (Figure 10).

Outre son rôle métabolique, la mitochondrie participe également aux décisions de vie ou de mort cellulaire par apoptose et ou un rôle dans de nombreuses pathologies humaines (héréditaires ou acquises), dans l'immunité innée et réponses antivirales, dans l'inflammation et dans le vieillissement (Mansouri et al., 2018; Wallace et al., 1999).



Figure 10 : Schéma simplifié des principales fonctions mitochondriales et le stress oxydant associé (schéma adapté d'après Mansouri et al, 2018). TCA : cycle tricarboxylique (ou de Krebs) ; αCT : α - cétoglutarate ; FAS : fatty acid synthase ; CPT1 : carnitine palmitoyle transférase ; O2•- : anion superoxyde ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; ONOO• : peroxynitrite ; OH• : radical hydroxyl; ADNmt : ADN mitochondrial

Stress oxydant mitochondrial

La majorité des électrons donnés à la chaîne respiratoire migrent jusqu'à la cytochrome *c* oxydase (ou complexe IV) où ils se combinent avec des protons et l'oxygène pour former de l'eau (Figure 10). Cependant, certains électrons s'échappent de la chaine respiratoire bien en amont du complexe IV, et se combinent anormalement à l'oxygène formant l'anion superoxyde (O₂-.). Cette espèce réactive de l'oxygène peut se transformer en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la MnSOD (Figure 10). L'O₂- et H₂O₂ peuvent également participer à la réaction de Fenton en présence de fer pour générer le radical hydroxyle •OH, extrêmement réactif. O₂- peut aussi interagir directement avec le monoxyde d'azote NO pour former le radical peroxynitrite ⁻ONOO[•], également très réactif.

En conditions normales, ces espèces réactives de l'oxygènes (ERO) sont produites en petites quantités et sont détoxifiées par deux enzymes clés : la Superoxyde Dismutase à Manganèse (MnSOD) et la Glutathion peroxydase (Fromenty, 2010). Mais en cas d'inhibition de la chaîne respiratoire (suite à une intoxication par certains xénobiotiques par exemple), la formation de ces ERO est augmentée, et les systèmes de détoxifications sont débordés entrainant un stress oxydant intense au niveau mitochondrial. Ces ERO peuvent alors provoquer des lésions oxydantes des lipides, des protéines et de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Figure 10).

Dynamique mitochondriale

Du fait de leurs rôles importants dans la survie cellulaire, les mitochondries sont des organites d'une très grande dynamique, flexibilité et adaptabilité. En effet, cet organite est capable de changer de morphologie, de nombre (masse mitochondriale) ou de fonctions en réponse à des situations de stress (Golpich et al., 2017; Mansouri et al., 2018).

Divers processus bien contrôlés sont impliqués dans ces phénomènes. C'est le cas de la biogénèse mitochondriale, fusion et fission mitochondriales, mitophagie et la réponse de l'organite au stress dû aux agrégats protéiques ou de protéines mal repliées (ou UPR_{mt} : Unfolded Protein Response mitochondrial) (Mansouri et al., 2018). Ces processus peuvent être des cibles de certains médicaments (Du et al., 2017).

Biogénèse mitochondriale : La biogénèse mitochondriale (BM) est la croissance et division des mitochondries existantes, résultant en l'augmentation de la masse mitochondriale de la cellule. L'objectif de la BM est de maintenir et de restaurer l'homéostasie énergétique durant la privation nutritive ou à la suite d'agressions toxiques (Du et al., 2017; Mansouri et al., 2018). La BM est sous contrôle nucléaire et est dépendante de différents facteurs de transcription notamment PGC1a (Peroxisome proliferator activator receptor y coactivateur 1 α). Celui-ci régule à la fois la réplication de l'ADNmt et induit l'expression de NRF1 et NRF2 (nuclear respiratory factor 1 et 2) qui eux même régulent la transcription des gènes nucléaires codant pour les complexes de la chaîne respiratoire (Baker et al., 2007; Mansouri et al., 2018; Scarpulla, 2008). Du fait de la double origine génétique des protéines mitochondriales (ADN nucléaire et ADNmt), le facteur de transcription mitochondrial mtFA (ou Tfam) contrôle aussi la réplication et la transcription de l'ADNmt permettant ainsi l'expression des protéines codées par l'ADNmt (complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire) dans les même proportions stœchiométriques que leurs homologues codées par l'ADN nucléaire (Russell et al., 2003; Tiraby and Langin, 2005). Dans certains cas, la BM peut déterminer aussi si une cellule survivra ou non (Jornayvaz and Shulman, 2010; Scarpulla, 2008) : c'est un mécanisme protecteur et ses altérations contribueraient à plusieurs formes de lésions tissulaires (Finck and Kelly, 2007; Funk et al., 2010; Rasbach and Schnellmann, 2007; Rehman et al., 2014).

Fusion/fission : la fusion mitochondriale génère des mitochondries allongées selon les tissus, et permet de maintenir une intégrité morphologique et fonctionnelle de la mitochondrie. Un des rôles important de la fusion mitochondriale est de favoriser les fonctions complémentaires entre les mitochondries à travers l'échange de protéines, de complexes respiratoires et de l'ADNmt. Toute anomalie au niveau du processus de fusion entrainerait donc une altération de l'ADNmt avec une augmentation des taux de mutations (Bertholet et al., 2016). Ce mécanisme fusionnel met en jeu deux protéines de la membrane externe mitochondriale : la mitofusine I et mitofusine II (MFN I et MFN II) et une protéine localisée au niveau de la membrane interne OPA 1 (Protein Optic atrophic 1) (Burté et al., 2014).

A l'inverse, la fission permet à la mitochondrie de se séparer de ses parties altérées (membranes endommagées, ADNmt et protéines oxydés, …) (Mansouri et al., 2018). Lorsqu'une mitochondrie subie le phénomène de fission, celle-ci se scinde en une partie saine et une partie endommagée/altérée. La partie altérée est ensuite éliminée

par mitophagie, et la partie saine de la mitochondrie va pouvoir subir le phénomène de fusion avec d'autres petites mitochondries saines afin de restaurer un niveau normal de mitochondries dans le tissu. L'acteur majeur de la fission est la protéine DRP1 (*dynamin-Related-Protein 1*), protéine soluble et ubiquitaire capable d'induire la scission entre les 2 futures mitochondries par contraction des membranes (Mansouri et al., 2018).

Mitophagie : le processus de mitophagie permet d'éliminer des mitochondries trop altérées afin d'éviter le relargage de leurs contenus dans le cytosol (Mansouri et al., 2018). En effet, du fait de leur origine bactérienne, les mitochondries ont gardé des vestiges bactériens, ce qui rend leur contenu immunogène. C'est le cas de l'ADNmt, riche en motifs CpG hypométhylés, qui est capable d'activer les récepteurs Toll-Like TLR 9, et des peptides formylés activant les récepteurs FPR (Formyl Peptide Receptor) (Mansouri et al., 2018). Ainsi, ces constituants mitochondriaux doivent à tout moment être séquestrés par les membranes mitochondriales et ne doivent en aucun cas être relargués dans le cytosol ou dans le milieu extracellulaire. Dans le cas contraire, ceux-ci peuvent induire une inflammation excessive ou choc septique en absence de toute infection (Mansouri et al., 2018). Lorsque des mitochondries sont trop altérées, et pour éviter une telle situation, se met alors en place le processus de mitophagie.

La mitophagie met en œuvre la protéine PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1), une protéine membranaire sensible à l'état du potentiel membranaire mitochondrial. En condition physiologique, PINK1 est rapidement ubiquitinée et dégradée par le protéasome. En cas de stress mitochondrial excessif ou d'altérations des membranes mitochondriales, PINK1 est recrutée au niveau mitochondrial où elle recrute et phosphoryle la protéine PARKIN, activant ainsi l'activité Ubiquitine Ligase de cette dernière. Ensuite, les mitochondries marquées par les protéines PARKIN sont reconnues de façon sélective par les protéines LC3 II et LC3I (Light Chain 3) formant le mitophagosome dans lequel l'organite défectueux est séquestré avant sa dégradation finale par les lysosomes (Galluzzi et al., 2012).

UPR mitochondrial (UPR_{mt}) : les réponses UPR_{mt} permettent le maintien de l'homéostasie mitochondriale et le contrôle de l'équilibre stœchiométrique entre les protéines codées par l'ADNmt et l'ADN nucléaire. Elles détectent également les protéines mal repliées et permettent l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire tout en assurant le contrôle de qualité mitochondriale (Fiorese et al., 2016;

Mansouri et al., 2018; Mottis et al., 2014). Lors de l'UPRmt, une protéine kinase phosphoryle le facteur de transcription JUN stimulant la production de la protéine chaperonne HSP60 (Heat shock Protein 60). Les protéines HSP60, HSP10 et HSP70 permettent l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire et les peptidases LonP1 et CLpP dégradent les protéines mal repliées (Fiorese et al., 2016; Mansouri et al., 2018; Mottis et al., 2014).

2) ADN mitochondrial (ADNmt)

Organisation

L'ADNmt est une molécule double brin de petite taille (16 550 paires de bases), bicaténaire et superenroulé (Figure 11). La majeure partie de sa séquence est codante : les régions non codantes abritent l'origine de la réplication du brin lourd et les promoteurs des deux brins. L'ADNmt comporte 37 gènes et code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire, deux ARN ribosomaux (12S et 16S) et 22 ARN de transferts. Les 13 protéines codées par l'ADNmt sont 7 protéines du complexe I, 1 protéine du complexe III, 3 protéines du IV, et 2 protéines du complexe V (Figure 11) (Anderson et al., 1981; Bibb et al., 1981). Les autres protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire, synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans la mitochondrie. L'ADNmt existe à plusieurs centaines ou milliers de copies par cellule (Bogenhagen and Clayton, 1974). Dans le foie, on estime que le nombre de copies d'ADNmt par hépatocytes est d'environ 800 à 1000 (Foschini et al., 198).



Figure 11 : Organisation schématique de l'ADN mitochondrial. OH et OL : Origines de réplication respective des brins lourd et léger. D-Loop : Région de contrôle de la réplication. (Schéma adapté de Mitomap.org)

Réplication de l'ADNmt

Les mitochondries sont renouvelées dans toutes les cellules indépendamment du cycle cellulaire. Ainsi, le génome mitochondrial se réplique même dans celles ne se divisant pas. La mitochondrie possède un mode de réplication spécifique, différent de celui des procaryotes. Chaque brin d'ADNmt a sa propre origine de réplication, OH pour le brin lourd et OL pour le brin léger (Anderson et al., 1981). La réplication de l'ADNmt débute par la synthèse d'un court transcrit par l'ARN polymérase mitochondriale, à partir du promoteur du brin léger (LSP). Ce transcrit servira d'amorce pour la réplication du brin lourd par l'ADN polymérase y mitochondriale, dont l'origine est nucléaire. Le brin lourd naissant déplace un segment d'ADN parental créant ainsi une structure en triple brin dite boucle D ou boucle de déplacement (Kasamatsu et al., 1974). La réplication du brin léger ne débute que lorsque l'extension du brin lourd naissant atteint les deux tiers de l'ADNmt exposant ainsi OL à la polymérase y. Elle commence sur le brin opposé et dans la direction inverse. L'amorce d'ARN initiant la synthèse du brin léger est générée par une primase, également d'origine nucléaire (Lecrenier and Foury, 2000; Taanman, 1999). Il a également été décrit un autre mode de réplication de l'ADNmt, mode dans lequel la synthèse des deux brins est synchrone et unidirectionnelle. Ce mode de réplication pourrait être utilisé en cas d'urgence par les mitochondries, par exemple, pour restaurer des taux normaux d'ADNmt à la suite d'une déplétion transitoire de celui-ci (Holt et al., 2000). Lors de sa réplication, cet ADN superenroulé est transformé en molécule circulaire relâchée par les topoisomérases mitochondriales (Larosche et al., 2007; Mansouri et al., 2018).

Transcription et traduction

L'ADNmt ne possède qu'un seul promoteur pour chacun des deux brins (Montoya et al., 1982). Les promoteurs du brin lourd et du brin léger situés dans la région de la boucle D-loop, initient la transcription de leurs brins respectifs de façon indépendante (Figure 11). La synthèse aboutit à la formation d'un ARNm polycistronique qui est ensuite clivé par des nucléases mitochondriales, libérant les différents ARNs mitochondriaux (Clayton, 1984).

Les ARNm codés par l'ADNmt sont traduits dans la mitochondrie selon un code génétique identique au code génétique bactérien. De même, la transmission de l'ADNmt (et ses mutations) ne répond pas à l'hérédité mendélienne mais à une hérédité maternelle.
Sensibilité et altérations de l'ADNmt

L'absence de protéines histones protectrices rend l'ADNmt extrêmement sensible au stress oxydant et sa proximité avec la chaîne respiratoire, principal site de production des EROs, l'expose directement aux attaques oxydatives. De plus, son système de réparation semble être moins performant que celui de l'ADN nucléaire (Wallace et al., 1999).

Des travaux effectués par l'équipe du Dr. Mansouri suggèrent que l'ADN mitochondrial est une cible fréquente de la toxicité de l'alcool et médicaments (Larosche et al., 2007, 2010; Mansouri, 2003; Mansouri et al., 1997, 1999). En effet, en augmentant le stress oxydant mitochondrial, l'alcool entraîne des cassures simples et doubles brins chez la souris (Larosche et al., 2010; Mansouri et al., 1999) et accélère le vieillissement oxydatif de l'ADNmt chez des patients alcooliques (Mansouri et al., 1997). Par ailleurs, en inhibant les topoisomérases mitochondriales, la tacrine (anti-Alzheimer) ou le tamoxifène (anticancéreux anti-oestrogènique) inhibent la réplication de l'ADNmt engendrant une déplétion sévère de celui-ci chez la souris (Larosche et al., 2007; Mansouri, 2003).



Figure 12 : Coupes histologiques de foies atteints d'une stéatose. A. Stéatose microvésiculaire ; **B.** Stéatose macrovacuolaire (d'après le cours dispensé par Dr B. Fromenty, Master 2 de Toxicologie Humaine Evaluation des Risques et Vigilances, Paris Descartes)

3) Stéatoses et stéatohépatites : causes et mécanismes

La stéatose hépatique et la stéatohépatite sont des lésions du foie en grande partie liées à des dysfonctionnements mitochondriaux (Mansouri et al., 2018). On distingue deux types de stéatoses hépatiques : la stéatose macrovacuolaire et la stéatose microvésiculaire, qui se différencient à la fois par leurs aspects histologiques et par leurs caractéristiques cliniques et physiopathologiques (Figure 12).

La stéatose macrovacuolaire se caractérise par la présence d'une grande vacuole lipidique qui repousse le noyau à la périphérie de l'hépatocyte (Figure 12B). En absence d'autres lésions du foie, la stéatose macrovacuolaire est une lésion relativement bénigne. L'alcool, l'obésité, le diabète et certaines dyslipidémies peuvent être à l'origine de ce type de stéatose. L'apparition d'une stéatose macrovacuolaire pourrait résulter d'une inhibition modérée de la fonction mitochondriale et en particulier de la β -oxydation. D'autres mécanismes comme une augmentation de la mobilisation des acides gras du tissu adipeux vers le foie, une augmentation de la synthèse hépatique des acides gras, une augmentation de l'estérification des acides gras en triglycérides et/ou une diminution de la sécrétion hépatique des triglycérides, peuvent également être impliqués (Fromenty et Pessayre, 1995).

La stéatose microvésiculaire se caractérise par l'accumulation de fines gouttelettes de triglycérides et d'acides gras dans le cytoplasme de l'hépatocyte, laissant le noyau en position centrale (Figure 12A). La stéatose microvésiculaire peut être soit isolée ou associée à d'autres lésions (notamment à une stéatose macrovacuolaire). Isolée, la stéatose microvésiculaire a une sévérité variable et peut être asymptomatique. Dans des formes sévères, elle est fréquemment associée à une hypoglycémie, une insuffisance hépatique et rénale et une pancréatite pouvant aboutir au décès du patient (Fromenty and Pessayre, 1995). Les étiologies d'une stéatose microvésiculaire sont variables : prise d'alcool ou de certains médicaments, cytopathies mitochondriales, déficits génétiques touchant les enzymes de la β -oxydation, ou lors d'une grossesse (stéatose hépatique aiguë gravidique ou SHAG) (Fromenty and Pessayre, 1995).

Le principal mécanisme impliqué dans la stéatose microvésiculaire est une diminution importante de la β-oxydation mitochondriale des acides gras. Cette inhibition peut être directe (Pessayre and Fromenty, 2005), ou secondaire à une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire qui peut être liée aux altérations de l'ADNmt (Mansouri et al., 2018).

Parallèlement à l'inhibition de la β -oxydation, la stéatose hépatique peut également être due à une diminution de la sécrétion hépatique des lipoprotéines (Lettéron et al., 2003). Ce mécanisme additionnel, indépendant de la mitochondrie, semble accentuer la formation de vésicules lipidiques mais ne pas être responsable de la sévérité de la maladie (Lettéron et al., 2003). Un autre mécanisme important dans le développement des stéatoses hépatiques est l'augmentation de la synthèse De novo d'AG (Mansouri et al., 2018).

La stéatohépatite est caractérisée par la présence concomitante d'une stéatose, d'une inflammation et d'une fibrose avec résistance à l'insuline (Mansouri et al., 2018; Pessayre et al., 2001). Elle peut évoluer en cirrhose voire en carcinome hépatocellulaire. Elle est essentiellement observée lors d'une consommation chronique d'alcool mais, elle peut être également due à d'autres causes telles que la prise de certains médicaments ou associée à l'obésité (stéatohépatite non alcoolique ou NASH) (Mansouri et al., 2018; Pessayre et al., 2001).

La présence concomitante de lipides accumulés dans le foie (lors d'une stéatose hépatique) et d'un stress oxydant mitochondrial est responsable de la peroxydation lipidique générant la malonedialdéhyde et le 4-hydroxynonénal. Ces produits de la peroxydation lipidique, les ERO et les cytokines pro-inflammatoires semblent jouer un rôle important dans l'évolution de la stéatose en stéatohépatite et dans le développement de la fibrose (Mansouri et al., 2018; Pessayre et al., 2001).

4) La mitochondrie : cible des xénobiotiques hépatotoxiques

Plusieurs études ont identifié la mitochondrie et son ADN comme des cibles de la toxicité des médicaments et de l'alcool (Mansouri et al., 2018; Massart et al., 2017; Pessayre et al., 2001). L'hépatotoxicité est initialement due à la formation de métabolites réactifs mais les altérations mitochondriales jouent un rôle majeur dans le mécanisme final de la mort cellulaire (Pessayre et al., 2001). Plusieurs médicaments sont responsables d'une diminution de la β -oxydation et ainsi d'une stéatose hépatique par des mécanismes variés. Cette inhibition a été observée lors d'une séquestration du CoA (par l'aspirine), une inhibition directe des enzymes de la β -oxydation (amiodarone, acide valproïque), un vieillissement oxydatif accéléré de l'ADNmt (alcool), une inhibition de la réplication de l'ADNmt (tacrine et tamoxifène) ou de son expression (interféron α) et enfin par un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire

(perhexiline) (Fromenty and Pessayre, 1995; Larosche et al., 2007; Mansouri et al., 1997, 2018; Massart et al., 2017).

V. Hypothèses et objectifs

Comme il a été rappelé précédemment, la stéatohépatite associe une stéatose, une inflammation et une fibrose hépatiques et est essentiellement due à des altérations du métabolisme lipidique (soit une inhibition de la β-oxydation ou une augmentation de la synthèse De novo d'AG).

La présence de stéatose et stéatohépatite chez certains patients traités par le 5-FU, l'Irinotécan ou par leur association suggère que ces médicaments sont capables d'interférer avec le métabolisme des lipides soit de façon directe ou indirecte.

Du fait que l'Irinotécan inhibe les topoisomérases et que le 5-FU interfère avec le métabolisme d'ADN, mon hypothèse de travail a été que ces médicaments pourraient inhiber la réplication de l'ADNmt hépatique et la chaîne respiratoire, ce qui altérerait secondairement la β -oxydation des acides gras et favoriserait la survenue d'une stéatose chez la souris.

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier les effets de ces deux médicaments sur les taux d'ADNmt, la dynamique mitochondriale (biogénèse, fusion/fission, mitophagie, UPRmt), le stress oxydant, l'inflammation, la fibrose et l'histologie hépatique.

Matériel et méthodes

I. Produits chimiques

L'irinotécan, 5-FU, le chloroforme, le 2-mercaptoéthanol et le rouge Ponceau sont de chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier). L'éthanol absolu provient de vWR BDH chemicals (Fontenay-sous-bois). Le 2-propanol (Isopropanol) est fourni par Merck. Le TBE et l'agarose standard proviennent d'EUROMEDEX. Le TRIzol ® Reagent provient d'Ambion. Le SDS 10% liquide, le Temed et le SYBR Safe DNA gel stain proviennent de chez InVitrogen. Le SDS est fourni par Fisher Bioreagent. Le SYBR Green I master provient de chez Roche Diagnostic. Le Tween ® 20 Molecular Biology Grade provient de chez Promega (Madisson, USA). La protéinase K provient de chez QIAGEN (Hilden, Allemagne).

Les anticorps dirigés contre COX1, TFAM, PGC1a, HSP70, PINK1 et PARKIN proviennent de chez Eurofins Genomics. Les amorces nucléotidiques sont synthétisées par Eurogentec. Les produits utilisés lors de la rétro-transcription (Random Oligonucléotides, SuperReverse Transcriptase, dNTP, Buffer 5X, DTT, RNAse OUT) sont fournis par Invitrogen et Applied Biosystem (Austin, USA).

II. Animaux et traitements

Cette étude a été réalisée chez des souris C57 BL6 mâles de 8 semaines et d'un poids moyen de 28g. Les animaux sont hébergés à l'animalerie de la Faculté de Médecine Xavier Bichat, dans des conditions conformes aux règles de Bonnes Pratiques de Laboratoires (OCDE-CEE). Les souris sont nourries ad libitum avec un régime standard équilibré (biscuits A04, UAR, Villemoissons-sur-Orge, France).

Les animaux sont répartis en 4 groupes aléatoirement : un groupe témoin (injection de 200µl de NaCl 0.9%), un groupe traité par l'Irinotécan à 100 mg/kg, un groupe traité par le 5-Fluorouracile à 50 mg/kg et un groupe ayant reçu l'association des deux médicaments. Le nombre d'animaux par groupe varie de 3 à 15. L'administration de ces médicaments a eu lieu par voie intrapéritonéale 5 jours sur 7 pendant 4 semaines. Au terme de ces traitements, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale.

III. Dosage des paramètres plasmatiques

Avant le sacrifice, le sang de chaque souris à a été prélevé par voie rétro-orbiale à l'aide d'une pipette pasteur héparinée. Les prélèvements de sang ont ensuite subi une centrifugation (5000 rpm, 5 min, température ambiante) et le plasma a été récupéré et conservé à -20°C en vue du dosage des paramètres suivants : triglycérides, Alanine-

Amino Transférases (ALAT), et Aspartate aminotransférases (ASAT). Ces paramètres ont été déterminés grâce à un analyseur automatique (Olympus AU 400, Rungis, France) et des kits commerciaux (Olympus Diagnostic et Randox Diagnostic, Montpellier) par le laboratoire de biochimie de l'IRF002 (Bichat).

IV. Analyses histologique et immunohistochimique des coupes de foie Après prélèvement, le foie a été immédiatement fixé dans une solution de formaldéhyde 5%. Le prélèvement est déshydraté par immersion dans une série de bains alcooliques de degré croissant et dans des bains de toluène avant d'être inclut dans des blocs de paraffine. Des coupes de 5 μm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome et sont recueillies sur des lames de verre. Enfin, ces coupes subissent une réhydratation avant d'être colorées par l'hématoxyline qui colore les noyaux en violet et par l'éosine qui colore le cytoplasme en rose. Pour étudier la fibrose, d'autres lames ont été colorées par le rouge serius (coloration du collagène) ou analysées par immunohistochimie utilisant un anticorps anti-αSMA.

- V. Extraction de l'ARN hépatique total et analyse de l'expression des gènes d'intérêts par qPCR
 - 1) Purification des ARN totaux :

L'ARN hépatique total a été isolé par la méthode d'extraction au TRIzol®. La biopsie de foie (50 mg) est lysée dans 1ml de TRIzol® puis broyée par la machine Tissus Lyser II (Qiagen) 45 secondes à 50 Hz à trois reprises. Après lyse du tissu, 200µL de TRIzol sont ajoutés de façon à obtenir trois phases : la phase aqueuse supérieure contenant les ARNs totaux, une interphase correspondant à l'ADN et une phase organique inférieure contenant les protéines. La phase aqueuse est prélevée, et les ARNs totaux sont précipités par un même volume d'isopropanol. Ensuite, les ARNs sont précipités par centrifugation à 17 000xg pendant 20 minutes à 4°C. Le culot d'ARNs obtenus est lavé dans 1mL d'éthanol 75% puis centrifugés pendant 5 minutes à 17 000 xg à 4°C. Apres élimination du surnageant et séchage des culots d'ARNs, ceux-ci sont repris dans 30µL d'eau RNase free et dosés à 260 nm par le Nanodrop®.

2) Synthèse de l'ADNc par Transcription inverse :

La rétro-transcription permet d'obtenir les ADNc à partir des solutions d'ARN. La première étape consiste à rétrotranscrire les ARN en ADN. Cette étape se fait en présence de 2µg d'ARN totaux, 10mM d'héxamères nucléotidiques aléatoires, et 200 U/L de RNase Inhibitor pendant 65°C pendant 5 minutes. Puis une PCR est réalisée en ajoutant le mix 2 contenant 10mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 250mM de tampon « first-strand buffer » (Tris-HCl pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 0,1mM de DTT 0,1 M, 200UI/µL de RNase out (Recombinant Ribonuclease Inhibitor) et 1µL de SuperScript II reverse transcriptase. La transcription inverse est réalisée par incubation du mélange à 42°C pendant 60 minutes. La réaction est ensuite arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes puis inactivation de l'enzyme. Les ADNc obtenus sont conservés immédiatement à -20°C. Ces étapes sont réalisées avec un thermocycleur (Epperndorf Vapo.protect).

 Quantification relative de l'expression des ARNm par qPCR en présence de SybrGreen :

La qPCR permet d'estimer le niveau d'expression d'un gène en suivant l'amplification de son ADNc en temps réel. La détection des amplicons est rendue possible grâce à leur marquage par le SybrGreen qui s'incorpore entre les brins d'ADN au fur et à mesure de sa synthèse lors de la PCR. Le niveau d'expression du gène étudié (matrice initiale) est ainsi proportionnel à la fluorescence émise par le SybrGreen incorporé.

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées en qPCR

Amorces	Orientation	Séquences (5' - 3')			
ARNr S6	Sens	TGT CGC CCA GTA TGT TGT CAG GAA G			
	Antisens	TGC TTT GGT CCT GGG CTT CTT ACC			
	Sens	CGA CAG CTA AGA CCC AAA CTG GG			
ARNr 18 S	Antisens	CCC ATT TCT TCC CAT TTC ATT GGC			
001/1	Sens	GAT AAC CGA GTC GTT CTG CAA			
COXI	Antisens	CCC TGG TCG GTT TGA TGT TAC			
500 (Sens	CAA CAT GCT CAA GCC AAA CCA ACA			
PGC 1 a	Antisens	CGC TCA ATA GTC TTG TTC TCA AAT GGG			
4 DN/mt	Sens	CGA CAG CTA AGA CCC AAA CTG GG			
ADNMT	Antisens	CCC ATT TCT TCC CAT TTC ATT GGC			
Tfam	Sens	GGAGGCAAAGGATGATTCGG			
Пат	Antisens	TCGTCCAACTTCAGCCATCT			
USDED	Sens	AGTGTTCAGTCCATTGTCCC			
1131 00	Antisens	TGACTGCCACAACCTGAAG			
	Sens	CAGGCGGTGCCTATGTCTC			
TNF 0	Antisens	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG			
DINK1	Sens	GCC AAC ACT GAA CTT TGC TT			
	Antisens	GCT GGT TGC TGC TTA CAA AT			
PARKIN	Sens	TCC GAA GAT TCC TAC CTT CC			
	Antisens	AGG GGC TGC TTC TGT AAT CT			
Mitofusine I	Sens	AGTGTATCTCGCAGTCAG			
WilloldSille I	Antisens	TTCCCATGCCATCTTCTA			
Mitofusine II	Sens	TTCTCGATGCAACTCCATCGTC			
	Antisens	TCCTGTGGGTGTCTTCAAGGAA			
CL nP1	Sens	ATATACTCGAGGCTGTTGCG			
	Antisens	CCACCTGGGCTGTTGATATAC			
Lon P1	Sens	CTTCCGTTTCAGTGTTGGTG			
	Antisens	GGGTTCTCTGTCTTGGTCTTC			
DRP1	Sens	TCCCAATTCCATTATCCTCGC			
	Antisens	CATCAGTACCCGCATCCATG			
PPAR α	Sens	CATTTCCCTGTTTGTGGCTGCTATAA			
	Antisens	CTTAAGCACGTGCACAATCCCCTC			
SRFBP1 A	Sens	TAGTCCGAAGCCGGGTGGGCGCCGGCGCCAT			
	Antisens	GATGTCGTTCAAAACCGCTGTGTGTCCAGTTC			
PPAR v	Sens	ACTCATACATAAAGTCCTTCCCGCTGA			
	Antisens	CCCATCATTAAGGAATTCATGTCGTAGA			
FAS	Sens	TTCGGCTGCTGTTGGAAGTCAG			
	Antisens	ACCCACCCAGACGCCAGTGTTC			
MCAD	Sens	AGCAGAGAAGAAGGGTGACGAGTATGTT			
	Antisens	TACTTTAGGATCTGGGTTAGAACGTGCC			
SREBPc	Sens	ATCGGCGCGGAAGCTGTCGGGGTAGCGTC			
	Antisens	ACTGTCTTGGTTGTTGATGAGCTGGAGCAT			

Le mélange réactionnel pour chaque réaction qPCR est composé de 5 ng d'ADNc, 10µM de chaque amorce (sens et antisens), de 2X de SYBR Green I (Mix SybrGreen et TaqPolymérase) (Roche Diagnostic) et de l'eau RNase free dans un volume réactionnel de 20µL. Les réactions qPCR ont eu lieu sur l'appareil LightCycler LC480 (Roche Applied Sciences) selon le programme indiqué dans le tableau 2.

Deux gènes de référence, l'ARN 18S (ARN ribosomal 18S) et l'ARN 6S (Protéine ribosomal 40S), ont été utilisés. Les couples d'amorces spécifiques sont choisis à partir de publications et vérifiés à l'aide du logiciel Primer blast. La séquence des amorces utilisées est indiquée dans le tableau 1.

Etape	Temps	Température		
Activation de l'enzyme	10 minutes	95°C		
Dénaturation des brins d'ADN	10 secondes	95°C		
Hybridation des amorces	20 secondes	60°C		
Elongation	30 secondes	72°C		
Courbe de fusion	5 secondes	95°C		
	1 minute	65°C		

Tableau 2 : Programme de qPCR

4) Analyse des résultats de qPCR :

La méthode dite de $\Delta\Delta$ Ct est utilisée. Le Ct de chaque gène (nombre de cycle à partir duquel un signal fluorescent est détecté) est comparé à celui du gène de référence (Δ Ct) et permet d'effectuer une correction afin d'éliminer les effets de fluctuations. Un rapport entre les Ct des groupes traités par rapport au groupe témoin est effectué : on obtient ainsi le $\Delta\Delta$ Ct. La variation du nombre de copie du gène d'intérêt entre les échantillons comparés est égale à 2- $\Delta\Delta$ Ct.

VI. Analyse des protéines COX1, MnSOD, PGC-1α, TFAM, HSP70, CLpP, et LonP1 par Western blot

Homogénats de foie et dosage des protéines et du glutathion total hépatiques

Les homogénats de foie ont été réalisés de la façon suivante : des petits morceaux de foie ont été homogénéisés avec précaution à l'aide d'un potter en rotation lente (100 tours/min) dans un tampon contenant de l'HEPES 2 mM, du mannitol 220 mM, de l'EDTA II 0,1 mM et du sucrose 70 mM, pH 7,40. L'homogénéisation a eu lieu à froid dans la glace en présence d'inhibiteurs de protéases.

Un aliquot de cette préparation a été conservé pour doser les protéines selon la méthode de Lowry et al., 1951.Cette méthode de dosage colorimétrique est basée sur la fixation du bleu de Coomassie sur les groupements amines libres des protéines, et absorbe à une longueur d'onde comprise entre 465nm et 595nm. Ainsi l'absorbance est proportionnelle à la quantité de protéines. Elle est déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'albumine sérique bovine (BSA). Les échantillons et la gamme de BSA sont ajoutés à 250µL de réactif Bradford (BioRad Protein Assay) et leurs absorbances sont mesurées à 595 nm par un lecteur de microplaque (BioRad iMark, Microplate reader).

Le glutathion hépatique a été dosé par le kit « Glutathione assay kit » de chez Cliniscience selon les recommandations du fournisseur.

Migration et transfert

Les protéines sont dénaturées à chaud (95°C°) en présence d'un agent réducteur (Nu SDS Page 10X agent Sample Reducing Agent (Invitrogen)) et du bleu Tris Glycine (Sample Buffer 2X (Novex)) afin de suivre la migration. Les protéines (50ng) ont ensuite été séparées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide. La migration a eu lieu dans un tampon MOPS (Biorad, acide 3-morpholino-1-propanesulfonique, tampon) à 100 V pendant environ 1h.

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide de l'appareil « Biorad Trans-Blot turbo transfert System » selon les indications du fournisseur. Le gel est déposé sur la membrane de nitrocellulose en sandwich entre des feuilles de papier whatmann. Les protéines chargées négativement vont ainsi migrer vers l'anode et s'adsorber sur la membrane. Le transfert est réalisé à 1.0A/25V pendant 30minutes. Afin de vérifier le transfert des protéines sur la membrane de

nitrocellulose, la membrane est trempée dans une solution de rouge ponceau (SigmaAldrich).

Immunodétection

Les membranes ont été bloquées pendant 1h, à température ambiante et sous agitation, avec 5% de lait non gras dans du TBS [(Triphosphate buffered Saline) 1X – Tween 0,1%] et sont incubées toute la nuit, à 4°C et sous agitation, avec des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt (**Tableau 3**). Après deux lavages de 15 minutes avec du TBS 1X – Tween 0,1% (sous agitation), les membranes sont incubées pendant une heure à température ambiante et sous agitation avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (dilution 1/10000 dans du lait 5%). Après deux lavages de 15 min, à température ambiante et sous agitation, dans du TBS 1X – Tween 0,1%, les protéines ont été révélées par le système Immobilon Western Chemiluminescent HRP (Horseradish Peroxidase) Substrate (Millipore SAS) sur l'appareil Odyssée équipé d'une caméra (Amersham Imager 600). Les signaux protéiques obtenus ont été quantifiés par le logiciel ImageJ. Les protéines sont normalisées par rapport à l'expression de la tubuline.

Anticorps	Masse moléculaire	Espèce	Dilution AC IR	Dilution AC IIR	Fournisseur	Référence
Cox 1	130	Souris	1 : 5000	1 : 5000	Abcam	Ab14705
Tfam	25	Lapin	1 : 5000	1 : 5000	Calbiochem	DR1071- 100UG
PGC1 a	130	Souris	1 : 5000	1 :10000	SantaCruz technologies	Sc-517380
HSP70	70	Souris	1 : 5000	1 :10000	Enzolifesciences	ALX-804- 077-R100
MnSOD	30	Lapin	1 : 5000	1 :10000	Enzolifesciences	SOD-110
β-Tubuline	55	Souris	1 : 5000	1 :10000	SantaCruz technologies	Sc-398937

Tableau 3: Listes des anticorps utilisés lors des Western Blot

VII. Analyses Statistiques

Les tests statistiques sont réalisés grâce au logiciel GraphPad Prism® et Excel (Microsoft Corporation Pack Office XP- Microsoft Excel 2002). L'imprécision statistique des observations a été évaluée par l'Erreur Standard à la Moyenne. Pour toutes les expériences, la variable a été considérée comme normale. Les comparaisons entre groupes ont été réalisées par le Test t et par une analyse de la variance à un facteur (ANOVA). Le risque considéré était de 5%. Le seuil de significativité statistique entre les différents groupes a été fixé à p < 0,05.



Figure 13 : Concentrations plasmatiques des transaminases. A. ALAT ; B. ASAT n = 2-15 ; * p <0.05 ; ** p < 0.01



Figure 14 : Histologie hépatique après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. A. Groupe témoin (NaCl 0.9%) ; **B**. 5-FU (50 mg/kg) ; **C**. Irinotécan (100 mg/kg) ; **D**. 5-FU + Irinotécan. VP : Veine porte ; VC : Veine Centrolobulaire. (Agrandissement x750).



Figure 15 : Coupes de foie observées en microscopie optique après coloration au rouge sirius. Les flèches indiquent la formation de fibres de collagène entre les vaisseaux sanguins. **A.** Contrôle positif (CCl₄) ; **B**. Contrôle négatif (NaCl 0.9%) ; **C**. 5-FU ; **D**. Irinotécan ; **E**. 5-FU + Irinotécan (Agrandissement x20).

Résultats

I. 5-FU et Irinotécan augmentent les ALAT et ASAT plasmatiques

Les transaminases ASAT et ALAT sont des enzymes hépatiques relarguées dans le sang en cas de nécroses hépatiques. Les dosages nous montrent une augmentation des concentrations en ASAT et en ALAT pour les groupes traités par l'Irinotécan et le 5-FU par rapport aux témoins. Etonnamment, cette augmentation des transaminases n'est pas retrouvée dans le groupe de souris traitées avec l'association des deux anticancéreux (Figure 13).

II. 5-FU et Irinotécan provoquent des lésions histologiques et stéatose hépatique

Aucune lésion hépatique n'a été détectée chez les souris témoins. En revanche, un traitement prolongé des souris par le 5-FU (50 mg/kg), l'Irinotécan (100 mg/kg) ou par le 5-FU + Irinotécan pendant 1 mois altère l'architecture hépatique (Figure 14). Alors que 5-FU n'entraîne qu'une stéatose minime voire absente, l'Irinotécan ou le 5-FU + Irinotécan causent une stéatose hépatique massive de prédominance centrolobulaire (Figure 14). Aucun infiltrat inflammatoire n'a été observé quel que soit le traitement administré.

III. Etude de la fibrose hépatique

La fibrose hépatique a été examinée par coloration au rouge serius qui marque le collagène (Figure 15) et par immunohistochimie utilisant un anti-αSMA (Figure 16). Les fibres de collagène se développent autour des vaisseaux et forment des filaments rejoignant les vaisseaux les uns aux autres.

Alors que le degré de coloration du collagène est comparable chez les témoins (NaCl 0,9%) (Figure 15B) et les souris traitées individuellement par le 5-FU (Figure 15C) ou par Irinotécan (Figure 15D), cette coloration est plus accentuée dans le foie de souris traitées par l'association des deux médicaments (Figure 15E). Ce résultat indique que l'association 5-FU et Irinotécan est responsable d'une fibrose que l'on peut estimer de stade F2-F3 (Fibrose modérée). Un début de fibrose (stade estimé à F1 (Fibrose sans septa), peut être lié à l'âge de la souris) est toutefois observé chez les autres groupes incluant les témoins traités avec du NaCl 0,9%. Une souris témoins positif traitée par le CCl4 et ayant une fibrose de stade F3-F4 (Cirrhose) est montrée (Figure 15A).



Figure 16 : Observation par immunohistochimie d'αSMA. Les flèches indiquent la formation d'αSMA entre les vaisseaux sanguins. **A**. Contrôle positif (CCl₄) ; **B**. Contrôle négatif (NaCl 0.9%) ; **C**. 5-FU ; **D**. Irinotécan ; **E**. 5-FU + Irinotécan (Agrandissement X20).



Figure 17 : Quantification de l'ADNmt. **A**. Quantification des taux de l'ADNmt et de l'ADNn par Slot blot. ; **B**. Rapports ADNmt/ADNn (quantification des signaux par le logiciel ImageJ®). **p<0.01 ; n = 8-17.



Figure 18 : Conséquence de la diminution de l'ADNmt sur l'expression de la Cytochrome *c* oxydase 1. A. Expression relative de l'ARNm de COX 1 par qPCR. ; B. Expression de la protéine COX1 par rapport à la β -tubuline par Western Blot. Représentation de 2 souris par groupe. n = 3 - 12 ; * p<0.05 ** p< 0.01.

Ce résultat est confirmé par une méthode indépendante utilisant la coloration de l'α-SMA (marqueurs de myofibroblastes) par immunohistochimie (Figure 16). On note une fibrose avancée chez les souris traitées par l'association 5-FU + Irinotécan, et minime ou absente chez les souris sous 5-FU ou Irinotécan seuls (Figure 16).

IV. Irinotécan ou l'association Irinotécan et 5-FU sont responsables d'une déplétion de l'ADNmt

Puisque ces anticancéreux interfèrent avec la synthèse de l'ADN, leurs effets sur les taux de l'ADNmt chez la souris ont été analysés par Slot blot lors d'un précédent projet. Bien que non significatif, le 5-FU tend à diminuer les taux d'ADNmt après un mois de traitement (Figure 17). En revanche, à la fois l'Irinotécan seul ou en association avec le 5-FU entraine une déplétion significative de l'ADNmt qui est de l'ordre de 60% par rapport au groupe de souris témoins (Figure 17).

V. Irinotécan, 5-FU ou l'association diminuent l'expression de la sous unité 1 de la cytochrome *c* oxydase (COX1) codée par l'ADNmt

Une déplétion prolongée de l'ADNmt pourrait entraîner une diminution de l'expression des protéines et des ARNm codés par cet ADN. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai évalué par qPCR les ARNm (Figure 18A) et par Western blot les taux protéiques de la sous unité COX1 codée par l'ADNmt (Figure 18B). L'expression de l'ARNm COX1 est significativement diminuée dans le groupe de souris traitées par l'irinotécan (Figure 18A). Nous avons noté que cette diminution est plus importante chez les souris traitées par l'Irinotécan comparé aux autres groupes.

De même, l'expression de la protéine COX1 semble également être diminuée par les traitements (Figure 18B).

COX1 étant une sous unité du complexe IV, toute diminution de son expression pourrait avoir un effet négatif sur l'activité de de la chaîne respiratoire, ce qui pourrait avoir deux conséquences : une altération du flux des électrons le long de cette chaîne et ainsi une augmentation de la production mitochondriale des EROs, et un effet inhibiteur indirect sur la β -oxydation du fait de la non réoxydation des cofacteurs NADH et FADH₂.



Figure 19: Evaluation du stress oxydant mitochondrial et hépatique. A. Dosage du glutathion exprimé en mmol/mg de protéines. n = 1-5; **B**. Expression de la protéine MnSOD par Western blot rapportée à la β -tubuline. n = 2-10; **C**. Gel représentatif du Western Blot (Représentation de 2 souris par groupe) n = 2-10.



Figure 20 : Dosage des triglycérides en mmol/L dans les différents groupes. NaCl 0.9%,5-Fluorouracile(100mg/kg),Irinotécan(50mg/kg),5FU+Irinotécan ;* p<0.05 , ** p<0.01.</td>

VI. Irinotécan, 5-FU ou leur association tendent à diminuer le GSH hépatique et à augmenter les taux protéiques de MnSOD

Le stress oxydant mitochondrial a été évalué indirectement en examinant l'expression de l'enzyme antioxydante MnSOD (connue pour être induite en cas du stress oxydant), et en mesurant les taux du glutathion réduit GSH (antioxydant) au niveau hépatique.

Le 5-FU et l'irinotécan tendent à diminuer les réserves de GSH hépatique mais le nombre limité d'individus par groupe (n=1-5) ne permet pas d'atteindre une significativité statistique (Figure 19A). De la même façon, ces traitements tendent à augmenter l'expression de MnSOD (Figure19B, C) témoignant d'un stress oxydant (probablement modéré) au niveau du foie.

VII. Irinotécan, 5-FU ou leur association augmentent significativement les triglycérides (TG) plasmatiques

Les stéatoses et stéatohépatites (quel que soient leur origine) sont caractérisées par des altérations du métabolisme lipidique et une augmentation des TG hépatiques et plasmatiques.

La Figure 20 montre que l'Irinotécan, 5-FU ou leur association augmentent les TG plasmatique suggérant que ces esters d'AG s'accumuleraient dans le foie, confirmant les résultats histologiques exposés dans la Figure 14.

Une accumulation des TG dans le foie pourrait être la conséquence d'une inhibition de la β -oxydation mitochondriale des AG (qui peut être directe ou consécutive à une déplétion de l'ADNmt), et/ou conséquence d'une augmentation de la synthèse hépatique De novo des AG. Ainsi, nous avons évalué l'expression des facteurs de transcription et enzymes limitantes de la β -oxydation et de la biosynthèse d'AG.



Figure 21 : Expression relative des ARNm des facteurs de transcription et enzymes impliquées dans la β -oxydation. A. Expression relative de l'ARNm de PPAR α ; B. Expression relative de l'ARNm de PPAR α ; C. Expression de l'ARNm de MCAD par qPCR ; *** p<0.01 (n=2-13).



Figure 22 : Expression relative des ARNm des enzymes impliquées dans la synthèse De novo des acides gras. A. Expression relative de l'ARNm de SREBP-1a ; **B**. Expression relative de l'ARNm de SREBP1c ; **C.** Expression de FAS ; (n=3-12).

VIII. Effets de 5-FU, Irinotécan ou leur association sur l'expression génique de PPARα, PPARy, SREBP-1a, SREBP-1c, MCAD et FAS

PPARs sont les facteurs de transcription qui régulent l'expression des enzymes de la β -oxydation, et MCAD est la désydrogénase spécifique des AG à chaîne moyenne lors des premières étapes de la β -oxydation. SREBP-1a et SREBP-1c contrôlent l'expression d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des AG telle que la « Fatty Acid Synthase » (FAS).

A l'exception de l'association du 5-FU et de l'Irinotécan qui augmente l'expression de PPARγ (Figure 21B) par rapport au groupe traité par l'irinotécan seul, ces deux médicaments injectés individuellement ne modifient pas l'expression de PPARα (Figure 21A), PPARγ (Figure 21B), ou de MCAD (Figure 21C).

Ce résultat n'exclue cependant pas un effet inhibiteur direct de ces anticancéreux en intéragissant directement avec les enzymes de la β-oxydation.

De même, ces traitements ne modifient pas significativement l'expression de SREBP-1a, SREBP-1c ou FAS (Figure 22A-C).

Après avoir démontré que ces deux anticancéreux provoquent le développement d'une stéatose et fibrose hépatiques, altèrent l'ADNmt et son expression, augmentent le stress oxydant dans le foie et les TG plasmatiques, leurs effets sur la dynamique mitochondriale (Biogénèse, fusion/fission, UPRmt et mitophagie) et l'inflammation hépatique ont été évalués.

Le rationnel à la base de cette dernière partie de mon travail est que toute altération sévère de la dynamique mitochondriale pourrait être responsable de relargage des constituant mitochondriaux (ADNmt et peptides formylés) capable d'entraîner une inflammation excessive et favoriser le développement de fibrose (Mansouri et al., 2018).



Figure 23 : Impact du 5-FU et de l'Irinotécan sur la mitophagie. A. Expression relative de l'ARNm PINK1 ; **B.** Expression relative de l'ARNm PARKIN. * p<0,05 (n= 3-12).



Figure 24 : Effets du 5-FU et de l'Irinotécan sur l'expression de PGC1 α . **A.** Expression relative de l'ARNm PGC1 α . ; **B.** Expression de la protéine PGC1 α par Western blot rapportée à la β -tubuline. * p<0.05 *** p<0.001 (n=2-15).



Figure 25: Effets du 5-FU et de l'Irinotécan sur l'expression du facteur de transcription mitochondrial TFAM. A. Expression relative de l'ARNm TFAM ; B. Expression de la protéine TFAM par Western blot rapportée à la β -tubuline. * p<0.05 ** p<0.01 ****p<0.0001 (n=3-12).

IX. 5-FU, Irinotécan ou leur association altèrent le processus de mitophagie

Pour éviter des phénomènes inflammatoires, les mitochondries trop altérées doivent être éliminées par mitophagie (Mansouri et al., 2018) impliquant PINK1 et PARKIN (Figure 23).

L'Irinotécan, mais ni le 5-FU seul ni l'association, diminue significativement l'expression de l'ARNm PINK1 (Figure 23A) et PARKIN (Figure 23B) par rapport au groupe témoin NaCl 0,9%. Ces résultats suggèrent que l'Irinotécan est susceptible d'altérer la mitophagie. Paradoxalement, l'association Irinotécan et 5-FU n'a pas d'effet sur l'expression de PARKIN.

Cependant, une tendance à la diminution de l'expression des ARNm de ces 2 protéines est observée lors d'un traitement par le 5-FU (Figure 23A et B) par rapport au groupe témoin.

X. Effets du 5-FU, Irinotécan ou leur association sur la biogénèse mitochondriale

La biogénèse mitochondriale s'accompagne de la réplication de l'ADNmt contrôlée par PGC1a et TFAM (Mansouri et al., 2018). L'association Irinotécan et 5-FU n'aggrave pas d'avantage la déplétion de l'ADNmt causée par l'Irinotécan seul (Figure 24), suggérant que des phénomènes de biogénèse et réplication de l'ADNmt sont activés pour limiter une déplétion sévère. Ainsi, nous avons examiné les effets de ces anticancéreux sur les facteurs qui gouvernent ces processus.

Bien que non significative, une tendance à l'augmentation de la protéine PGC1α est observée après traitement par le 5-FU, l'Irinotécan ou leur association (Figure 24B). Le 5-FU, mais pas l'Irinotécan, semble augmenter aussi l'expression des ARNm de PGC1α d'environ 50% (Figure 24A).

A l'inverse de PGC1α, l'expression de l'ARNm du facteur de transcription Tfam diminue d'environ 60% dans le groupe traité par l'Irinotécan par rapport au groupe témoin (Figure 25A). Cette tendance à la diminution est confirmée en Western-Blot. Au contraire, l'association des deux anticancéreux augmente de manière significative l'expression de la protéine TFAM par rapport au groupe témoin (Figure 25A), et aux anticancéreux seuls (Figure 25B). Les incohérences observées entre les taux protéiques et les ARNm de Tfam et PGC1α nécessitent d'autres investigations pour en établir les raisons possibles.



Figure 26. Expression relative des ARNm et expression des protéines chaperonnes impliquées dans l'UPR_{mt}. A. Expression relative de l'ARNm de HSP60 ; n = 3-13 ; B. Expression de la protéine HSP70 par Western blot rapportée à la β -tubuline; ** p<0.01 ; n = 2-9.



Figure 27 : Expression relative des ARNm des protéases par qPCR. A. Expression relative de l'ARNm de CLpP ; **B**. Expression relative de l'ARNm de Lon P1 (n=3-12)



Figure 28 : Expression relative des ARNm et expression des protéines impliquées dans la fusion et la fission des mitochondries par qPCR. A. Expression relative de l'ARNm de Mitofusine I ; B. Expression relative de l'ARNm de Mitofusine II ; C. Expression de l'ARNm de DRP1 ; * p<0.05 ** p<0.01 ; n = 3-12

XI. Etude des effets du 5-FU et de l'Irinotécan sur l'UPRmt

Une déplétion de l'ADNmt peut altérer l'équilibre du rapport stœchiométrique entre les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire codées par cet ADN par rapport à leurs homologues codées par l'ADN nucléaire, ce qui peut altérer l'assemblage de ces complexes et provoquer une accumulation d'agrégats protéiques toxiques dans la mitochondrie (Mansouri et al., 2018). Pour pallier à ces phénomènes, les cellules ont développé des mécanismes permettant l'induction des gènes des chaperonnes mitochondriales HSP60 et 70 des protéases mitochondriales LonP1 et CLpP.

Ainsi, nous avons examiné l'expression des ARNm et des protéines HSP60 et HSP70 (Figure 26) et celle de LonP1 et CLpP (Figure 27). Le 5-FU, l'Irinotécan ou leur association ne modifie pas l'expression des ARNm HSP60 (Figure 26A), CLpP (Figure 27A) ou de LonP1 (Figure 27B).

Par contre, l'association 5-FU et Irinotécan augmentent l'expression de la protéine HSP70 (Figure 26B) par rapport au traitement 5-FU seul, suggérant que ces médicaments pourraient altérer l'homéostasie et le contrôle qualité des mitochondries.

XII. Effets du 5-FU et Irinotécan sur l'expression des Mitofusines 1/2 et DRP1 impliquées, respectivement dans la fusion et fission mitochondriales

Une diminution d'environ de 80% de l'expression de l'ARNm de la mitofusine I par rapport au groupe témoin est observée chez les souris traitées par l'irinotécan (Figure 28A).

Une différence entre les différents groupes traités est également à noter : en effet, la mitofusine I est sous exprimée dans le groupe Irinotécan par rapport au groupe 5-FU. L'expression de la mitofusine I semble être identique dans le groupe de souris traitées par l'association et dans celui traités par le 5-FU seul. Cette différence n'est pas retrouvée pour l'expression de l'ARNm de la mitofusine II (Figure 28B). Par contre, 5-FU et Irinotécan ne semblent pas altérer l'expression de DRP1 (Figure 28C) par rapport au groupe témoin.

L'ensemble de ces résultats semblent indiquer que ces anticancéreux sont capables d'altérer les mécanismes protecteurs et adaptatifs des mitochondries.

XIII. 5-FU, Irinotécan ou leur association ne modifient pas l'expression des cytokines proinflammatoires TNFα et IL6 au niveau hépatique.

L'expression des cytokines TNFa et IL6 dans le foie de souris a également été étudiée par qPCR. Nos résultats ont montré que ces deux anticancéreux n'induisent pas d'inflammation hépatique du moins dans notre modèle et nos conditions. Ce résultat confirme l'absence d'infiltrats inflammatoires comme a été noté lors de l'analyse de nos études histologiques montrées ci-dessus (Figure 14).



Figure 29 : Effets du 5-FU, de l'Irinotécan ou de l'association sur l'inflammation. A. Expression relative de l'ARNm d'IL-6. ; B. Expression relative de l'ARNm de TNF α . n = 3 à 12.

Discussion

Au cours de cette étude, nous avons identifié que l'ADNmt peut être une cible de la toxicité hépatique du 5-FU et de l'Irinotécan. Il a été en effet montré que ces anticancéreux diminuent les taux d'ADNmt hépatiques (Figure 17). Nous avons également démontré que le 5-FU, l'Irinotécan ou leur association augmentent les transaminases plasmatiques (Figure 13), provoquent l'apparition d'une stéatose et fibrose hépatiques (Figure 14 à 16) en absence d'inflammation, augmentent les triglycérides plasmatiques (Figure 20), et augmentent le stress oxydant mitochondrial mais n'altèrent pas l'expression des protéines impliquées dans la dégradation ou la synthèse des acides gras (Figures 21 et 22). Il est également montré que ces deux anticancéreux pourraient interférer avec la dynamique mitochondriale (Figure 23 à 25). Ainsi, la présente étude identifie, pour la première fois, les mitochondries, leur génome et leurs fonctions comme cibles importantes de la toxicité hépatique de ces deux médicaments.

Nous essayons de discuter successivement les mécanismes possibles d'altérations de l'ADNmt par le 5-FU et l'Irinotécan, leur répercussion sur les fonctions mitochondriales et le développement de la stéatose hépatique. De plus, les rôles possibles de telles altérations dans l'inflammation et la fibrose seront discutés afin de proposer des perspectives ouvertes par ce travail.

La diminution de l'ADN mitochondrial peut avoir plusieurs origines possibles : inhibition de sa réplication ou sa dégradation par des espèces réactives de l'oxygène et des nucléases mitochondriales ou encore par élimination des mitochondries altérées et leur génome par mitophagie (Mansouri et al., 2018).

Du fait des caractéristiques anti-métabolites du 5-FU qui inhibe la thymidilatesynthase, l'unique enzyme cellulaire à transformer l'uracile en thymidine (Paule et Brion, 2000), il n'est pas surprenant de constater que cet anticancéreux interfère avec la synthèse de l'ADNmt probablement par déplétion de la thymine. Bien que, la diminution de l'ADNmt induite par 5-FU reste modeste, cette étude contredit toutefois les résultats obtenus chez le rat montrant que des doses uniques et plus faibles de 5-FU n'étaient pas responsables d'altérations de l'ADNmt (Branda et al., 2002). Outre la différence de l'espèce utilisée, il est également important de noter que la nature de nos traitements prolongés (1 mois) et les dose de 5-FU utilisées au cours de notre étude (50 mg/kg) différaient des conditions utilisées chez le rat (Branda et al., 2002). De tels types de traitements sont fréquemment responsables des stéatoses et stéatohépatites chez l'homme (Costa et al., 2014; Fernandez et al., 2005; Vauthey et al., 2006; Zorzi et al., 2007). Il est bien établi que la stéatose hépatique est due à une diminution importante de la β -oxydation mitochondriale des acides gras, et que cette lésion précède l'apparition d'une stéatohépatite (Fromenty et Pessayre, 1995). L'inhibition de la β -oxydation peut être la conséquence d'une déplétion de l'ADNmt codant pour des protéines de la chaîne respiratoire, elle-même nécessaire au bon fonctionnement de l'oxydation des acides gras (Larosche et al., 2007). En effet, la chaîne respiratoire réoxyde les cofacteurs réduits (NADH, FADH₂) nécessaires à la β -oxydation (Fromenty et Pessayre, 1995 ; Mansouri et al., 2018).

Comme a été indiqué dans l'introduction de ce mémoire, l'Irinotécan altère l'activité des topoisomérases (Rougier et Lepère, 2005). Ainsi, une déplétion de l'ADNmt pourrait être induite par une interaction avec les topoisomérases mitochondriales comme cela avait été démontré dans d'autres modèles d'hépatotoxicités médicamenteuses (Larosche et al., 2007; Mansouri, 2003). En effet, pour se répliquer, l'ADNmt normalement superenroulé doit d'abord se dérouler. Ce relâchement est réalisé par l'action des topoisomérases I et II mitochondriales qui coupent transitoirement les brins d'ADN puis rétablissent sa continuité par ligation. Entre ces deux activités (coupure puis ligation), les topoisomérases forment des complexes covalents avec l'ADNmt. Il est connu qu'à faible concentration, les inhibiteurs de topoisomérases n'inhibent pas leur activité nucléase (clivage de l'ADN), mais plutôt son activité ligase empêchant la ligation des brins clivés (Freudenreich et Kreuzer, 1994). Cet empoisonnement des topoisomérases stabilise les complexes topoisomérases-ADN, augmentant ainsi la demi-vie de la forme relâchée clivée d'ADNmt. Ceci pourrait diminuer l'ADNmt superenroulé en faveur d'une augmentation de sa forme relâchée sensible aux attaques oxydatives telles que des cassures des brins et dégradation par des nucléases mitochondriales et les EROs.

La présence de coupures sur l'ADNmt (complexes topoisomérase-ADNmt clivé) peut également bloquer sa réplication. De plus, l'Irinotécan (molécule plane, Figure 5) pourrait posséder des propriétés intercalantes pouvant ralentir la réplication de l'ADNmt (Larosche et al., 2007). Ces deux mécanismes peuvent être à la base de la déplétion de l'ADNmt observée *in vivo* après 30 jours de traitement par l'Irinotécan et l'association 5-FU/Irinotécan chez la souris.

Une autre conséquence de l'inhibition des topoisomérases par l'Irinotécan est l'induction d'une génotoxicité (Ferguson, 1998). La réplication de l'ADN présentant des coupures simple brin peut générer des cassures doubles brin au niveau de la fourche de réplication et entraîner des délétions ou duplications. Cette génotoxicité pourrait aussi induire la mort hépatocytaire par apoptose. Bien que l'apoptose n'ait pas été recherchée au cours du présent travail, il a été démontré dans mon laboratoire d'accueil que l'association 5-FU et Irinotécan soit responsable d'une apoptose hépatique massive (résultats non publiés), suggérant ainsi une relation possible entre la déplétion de l'ADNmt et la stéatose ou l'apoptose.

Les résultats de Slot-blot montrent que l'association 5-FU/Irinotécan déplète spécifiquement l'ADNmt chez des souris traitées pendant 30 jours (Figure 10). Du fait de leur structure (amphiphile et cationique) avec une amine susceptible d'être protonable, ces médicaments pourraient se concentrer dans la mitochondrie expliquant leurs effets sélectifs sur l'ADNmt sans modification de l'ADN nucléaire (Figure 10). Deux études menées dans mon laboratoire d'accueil ont en effet rapporté que de telles molécules se concentrent environ 40 fois plus dans la matrice mitochondriale que dans le cytosol et déplètent massivement l'ADNmt (Larosche et al., 2007; Mansouri, 2003).

La déplétion d'ADNmt peut également être liée aux espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui induisent directement des cassures et dégradation des brins d'ADN, et entrainent l'activation des nucléases mitochondriales qui éliminent l'ADNmt trop endommagé (Larosche et al., 2010; Mansouri et al., 1999 ; 2018). Une inhibition directe de la chaîne respiratoire par le 5-FU, l'Irinotécan ou par l'association peut, en effet, augmenter la production d'ERO et le stress oxydant mitochondrial. Cette possibilité est confortée par les résultats montrant que ces médicaments déplètent le GSH témoignant d'un stress oxydant (Figure 12). Il est connu que MnSOD est inductible par les EROs et par les cytokines (Koch et al., 1994). Il a été rapporté qu'une formation persistante de peroxynitrites inactive la MnSOD et réduit sa stabilité (MacMillan-Crow et al., 1998). Une augmentation de peroxynitrites et de nitration des résidus tyrosines pourraient probablement diminuer l'activité de la MnSOD malgré l'augmentation de son taux protéique, ce qui pourrait aggraver davantage le stress oxydant au niveau mitochondrial. De tels mécanismes ont été observés dans d'autres conditions (Choumar et al., 2011; Larosche et al., 2010; Nilakantan et al., 2005).

Pour trancher définitivement entre une inhibition de réplication et une dégradation d'ADN par les EROs, il nous semble intéressant comme perspective d'examiner l'incorporation de la thymidine-[3H] dans l'ADNmt *in vivo* après des traitements par le 5-FU, l'Irinotécan et association 5-FU/Irinotécan et d'étudier l'activité de la polymérase γ mitochondriale *in vitro* en présence de ces médicaments (Demeilliers et al., 2002).

Indépendamment de l'ADNmt, la stéatose hépatique induite par le 5-FU, l'Irinotécan ou leur association peut également être due soit à une inhibition directe d'une ou de plusieurs enzymes impliquées dans la β -oxydation, soit à un effet direct de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (Larosche et al., 2007). La présente étude n'a pas permis de rechercher un effet inhibiteur direct sur l'activité des enzymes de la β -oxydation, mais l'expression des ARNm des enzymes impliquées dans ce processus métabolique a été étudiée, ce qui ne permet pas d'exclure cette possibilité. Ainsi, comme perspective, des études supplémentaires de β -oxydation s'imposent *in vivo* et *in vitro*.

Des résultats précédents *in vitro*, obtenus dans mon laboratoire d'accueil, ont montré que de fortes concentrations (jusqu'à 10nM) de ces deux anticancéreux directement incubés avec des mitochondries isolées n'inhibaient pas le complexe *in vitro*. Par contre *in vivo*, ces médicaments, individuellement ou en association, altéraient significativement l'activité du complexe I des mitochondries hépatiques (résultats non encore publiés). Ces altérations du complexe I pourraient être responsables d'une diminution de l'oxydation des acides gras et une augmentation de la formation des ERO au niveau mitochondrial (Mansouri et al., 2018).

Des expériences supplémentaires en présence d'acétoacétate sont toutefois nécessaires pour conclure sur un mécanisme d'inhibition direct ou indirect de la β -oxydation (Larosche et al., 2007). En effet, l'acétoacétate consomme le NADH pour produire du NAD+ et peut ainsi lever l'inhibition de la β -oxydation lorsque celle-ci est secondaire à une inhibition de la chaîne respiratoire (Deschamps et al., 1994). C'est le cas par exemple de la roténone (inhibiteur direct de la chaîne respiratoire) ou du tamoxifène (Larosche et al., 2007) qui entraînent secondairement une inhibition de la β -oxydation. Dans ce cas, l'ajout d'acétoacétate permet de restaurer les taux de NAD+ et de FADH nécessaires à la β -oxydation (Deschamps et al., 1994). Une autre enzyme limitante de l'oxydation des AG est la carnitine palmitoyle transférase 1 (CPT1) dont l'activité est sensible à divers médicaments (Larosche et al., 2007). CPT1 est

responsable de l'import des AG à chaîne longue dans la mitochondrie, et il serait d'une grande importance d'étudier son activité dans notre modèle.

Quel que soit le site d'action du 5-FU et de l'Irinotécan au niveau mitochondrial (effet sur l'ADNmt, sur la chaîne respiratoire, sur la β -oxydation ou des effets combinés), le résultat final est une inhibition de l'oxydation des acides gras expliquant la survenue de stéatoses et stéatohépatites chez les patients traités par ces médicaments. Il n'est pas surprenant de constater la gravité de ces lésions après des traitements de très longue durée. En effet, les conséquences métaboliques de l'inhibition de l'oxydation des acides gras, quel que soit son origine, sont multiples.

Tout d'abord, une déplétion énergétique peut survenir à jeun dans de nombreux organes (Fromenty et Pessayre, 1995). De plus, une diminution de la production de l'acétyl-CoA suite à une inhibition de la β -oxydation peut bloquer la pyruvate carboxylase, enzyme limitante de la néoglycogénèse et ainsi le glucose ne sera pas disponible à jeun.

Ensuite, une accumulation d'acides gras libres peut avoir de nombreux effets délétères au niveau mitochondrial et cellulaire. Ils inhibent compétitivement la pyruvate carboxylase (DiMauro et al., 1987), le cycle de Krebs et le processus d'uréogénèse entraînant une hyperammoniémie. Les acides gras à chaîne longue et leurs dérivés dicarboxyliques peuvent inhiber la chaîne respiratoire, découpler la phosphorylation oxydative et inhiber l'ADP/ATP translocase, activer la PKC et avoir des effets détergents sur les membranes mitochondriales. Lorsque l'inhibition de la β-oxydation est la conséquence d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, les perturbations métaboliques sont vraisemblablement plus sévères. En effet, de nombreuses déshydrogénases mitochondriales et cytosoliques sont dépendantes de NADH et FADH générés par la chaîne respiratoire (Fromenty et Pessayre, 1995). Ainsi, une déplétion de l'ADNmt, une inhibition de la β -oxydation et/ou de la chaîne respiratoire peuvent être responsables d'anomalies métaboliques aussi sévères qu'une hypoglycémie, hyperammoniémie, acidurie dicarboxylique, atteintes hépatiques sévères, anomalies neurologiques (avec encéphalopathie, convulsions et coma) et éventuellement le décès du patient (Fromenty et Pessayre, 1995). A long terme, une inhibition de la chaîne respiratoire peut affecter l'importation mitochondriale des protéines impliquées dans la β-oxydation.

Conjointement à l'inhibition de la β -oxydation qui est le mécanisme principal de la stéatose, les xénobiotiques peuvent aussi diminuer la sécrétion hépatique de lipoprotéines ce qui va d'avantage accentuer l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes (Lettéron et al., 2003) ou augmenter la synthèse De novo des AG (Mansouri et al., 2018). Des xénobiotiques inhibant à la fois la β -oxydation et la sécrétion des VLDL ou augmentant la néosynthèse d'AG, peuvent ainsi induire des lésions stéatosiques plus étendues (Fromenty et Pessayre, 1995; Lettéron et al., 2003; Mansouri et al., 2018). La possibilité d'une diminution de la sécrétion des VLDL est invraisemblable dans notre modèle au vu de nos résultats qui indiquent que l'association 5-FU/Irinotécan augmentait au contraire les triglycérides plasmatiques (Figure 20).

Nous avons également montré pour la première fois que le 5-FU et Irinotécan altèrent la dynamique mitochondriale (Figures 23 - 25). Le bon fonctionnement de toute cellule dépend du maintien de l'homéostasie des mitochondries (Mansouri et al., 2018). Toute altération de l'UPRmt, biogénèse, fusion et fission mitochondriales pourraient ainsi jouer des rôles importants dans la physiopathologie des stéatoses et stéatohépatites induites par le 5-FU ou l'Irinotécan. De même, la mitophagie est un autre mécanisme protecteur permettant de nettoyer les cellules des mitochondries trop altérées afin d'éviter tout relargage des constituants mitochondriaux dans le cytosol ou dans le milieu extracellulaire par nécrose (Mansouri et al., 2018). Tout défaut du processus de mitophagie induit par ces deux anticancéreux pourrait ainsi être responsable d'une inflammation excessive pouvant précipiter l'évolution de la stéatose en fibrose et nécro-inflammation (Mansouri et al., 2018).

En cas de déplétion d'ADNmt trop importante, la mitochondrie répond par des mécanismes de biogenèse mitochondriale afin de restaurer des taux normaux d'ADNmt et la masse mitochondriale. Dans notre étude, l'expression de PGC1a semble être augmentée. Une augmentation de ce facteur de transcription suggère une induction de la réplication afin de limiter la déplétion en ADNmt et par conséquent expliquerait la diminution relativement faible de COX1. Il est en effet connu que la déplétion de l'ADNmt doit franchir un seuil critique pour avoir des répercussions négatives sur la respiration mitochondriale (Rossignol et al., 2003). Cependant, l'expression de Tfam est également diminuée, et une telle diminution expliquerait également les changements observés des quantités d'ADNmt. Il est à noter

également, que Tfam permet la stabilité de l'ADNmt, et toute baisse de cette protéine augmente la vulnérabilité de l'ADNmt aux attaques oxydatives (Kunkel et al., 2019).

Une autre caractéristique de la stéatohépatite est l'inflammation. Etonnamment, les marqueurs de l'inflammation ne sont pas modifiés au cours des traitements dans notre modèle. Cette absence d'inflammation peut être expliquée par la durée des traitements (soit insuffisante ou trop importante). En effet, certains effets inflammatoires ont été observés plus précocement en phase aiguë au 7 ème jour de traitement dans d'autres modèles de toxicité de l'Irinotécan (Melo et al., 2008). Afin de déterminer une cinétique appropriée de l'inflammation, il serait important d'étudier les effets de 5-FU et Irinotécan à des périodes courtes (en jours) et plus longue (plus d'un mois) en mesurant à différents temps les marqueurs inflammatoires. Il a été aussi démontré que l'inflammation portale n'est observable qu'à partir de la 5_{ème} semaine de traitement dans un autres modèle murin (Costa et al., 2014). Il pourrait être intéressant d'évaluer également les infiltrats inflammatoires en étudiant l'expression des margueurs de neutrophiles, macrophages, monocytes ou Lymphocytes CD3+ au niveau hépatique. Il a été également montré que les cytokines pro-inflammatoires sont exprimées en association à une réponse UPRmt à chaque fois que la chaîne respiratoire est inhibée (Nargund et al., 2012).

De façon inattendue, la plupart des paramètres étudiés ne semblent pas être affectés de la même façon lors de l'association de l'Irinotécan et du 5-FU. Il a été montré sur des cellules intestinales cancéreuses, que l'association irinotécan et 5-FU pouvaient selon le schéma d'administration être synergique ou antagoniste et, par conséquent, être plus ou moins efficaces ou toxiques. Guichard et al, en 1998, ont montré que les effets de 5-FU sont différents selon l'exposition de ces cellules. Une exposition courte entrainait une action au niveau de l'ARN alors qu'une exposition plus longue affecterait d'avantage l'ADN et une inhibition de la thymidilate synthase (Guichard et al., 1998).

De façon générale, nos résultats suggèrent que l'irinotécan est plus toxique que le 5-FU au niveau hépatique. De plus, il a été montré dans mon laboratoire d'accueil que l'association de ces deux anticancéreux entrainaient une apoptose massive au niveau des hépatocytes. Ainsi, l'élimination des hépatocytes altérés par apoptose et la restauration de la masse hépatique par régénération cellulaire pourrait expliquer pourquoi l'association 5-FU et lrinotécan protègent par rapport à chacun de ces deux anticancéreux injectés séparément (Figures 13, 21, 23-28).

Conclusion

Outre la production d'énergie, les mitochondries jouent des rôles importants dans les décisions de vie ou de mort cellulaire par apoptose, dans de nombreuses maladies humaines et dans le vieillissement. Il n'est donc pas surprenant de voir que le 5-FU, l'Irinotécan, comme d'autres toxiques interférant avec les fonctions mitochondriales, soient responsables de maladies aussi sévères que les stéatohépatites et autres cytopathies mitochondriales acquises ou d'origine génétique.

Plusieurs nouveaux médicaments sont retirés chaque année du marché à cause de leur hépatotoxicité et il est urgent de comprendre et prévoir leur toxicité. Cette étude a permis d'identifier la mitochondrie et son génome comme nouvelles cibles dans l'hépatotoxicité des médicaments. Ces altérations mitochondriales entrainant une toxicité hépatique devraient être pris en compte et recherché systématiquement dans les études pré-cliniques de nouveaux médicaments.

Les résultats obtenus suggèrent qu'une administration prolongée de 5-FU, de l'Irinotécan et de l'association 5-FU/Irinotécan peut altérer l'ADNmt. Ce travail ouvre plusieurs perspectives. Il permettra peut-être de vérifier l'hypothèse selon laquelle une déplétion majeure et durable du génome mitochondrial hépatique par certains médicaments peut être responsable d'une stéatose et d'une apoptose hépatocytaire. Cette hypothèse est apparue plausible à l'examen d'autres résultats obtenus avec d'autres médicaments, mais il est nécessaire de confirmer ces résultats par l'évaluation des effets d'autres molécules ayant des structures et des profils de toxicité différents comme le tamoxifène (Larosche et al., 2007) entrainant une stéatose sans apoptose ou la tacrine entrainant une apoptose (Mansouri, 2003). Il est maintenant important de déterminer le site exact de toxicité de ses médicaments afin de proposer des mesures préventives de ces lésions.

Une première tentative préventive serait l'administration de l'acide folique qui permettrait de limiter la déplétion de la thymine et prévenir les altérations quantitatives de l'ADNmt. Par ailleurs, si une relation causale existe entre la déplétion de l'ADNmt et l'induction de l'apoptose, il serait intéressant de rechercher les mécanismes précis de cette induction. L'inhibition de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale est une hypothèse d'induction de l'apoptose (Feldmann et al., 2000). Si cela se confirme dans notre modèle médicamenteux, des moyens de prévention de l'ouverture du pore de transition de perméabilité médicamenteux.

permettrait d'offrir des solutions thérapeutiques pour prévenir ou guérir les hépatites, parfois fulminantes et mortelles, induites par certains médicaments qui perturbent le métabolisme de l'ADNmt.

Par ailleurs, l'homéostasie mitochondriale et la stabilité de l'état redox mitochondrial doivent être préservées pour limiter le stress oxydant et l'inflammation hépatique. Il serait intéressant de tester l'efficacité préventive et protectrice d'apport d'antioxydants comme le GSH ou le NAD₊ lors des traitements par 5-FU et Irinotécan ((Cover et al., 2005; Mathieu et al., 2016; Yu et al., 2019).

Enfin, cette étude et d'autres suggèrent que la recherche de la toxicité mitochondriale de nouveaux médicaments doit être considérée avant leur mise sur le marché.

Bibliographie

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290, 457–465.

Ando, Y., Saka, H., Asai, G., Sugiura, S., Shimokata, K., and Kamataki, T. (1998). UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan. Ann. Oncol. *9*, 845–847.

Aparicio, T., Ducreux, M., and Chaussade, S. (2008). 5-fluorouracile : données sur le métabolisme et place actuelle dans le traitement des cancers digestifs. /data/revues/03998320/00260001/38/.

Baker, M.J., Frazier, A.E., Gulbis, J.M., and Ryan, M.T. (2007). Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. Trends Cell Biol. *17*, 456–464.

Bertholet, A.M., Delerue, T., Millet, A.M., Moulis, M.F., David, C., Daloyau, M., Arnauné-Pelloquin, L., Davezac, N., Mils, V., Miquel, M.C., et al. (2016). Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. Neurobiol. Dis. *90*, 3–19.

Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., and Clayton, D.A. (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. Cell *26*, 167–180.

Bogenhagen, D., and Clayton, D.A. (1974). The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 249, 7991–7995.

Boisdron-Celle, M., Remaud, G., Traore, S., Poirier, A.L., Gamelin, L., Morel, A., and Gamelin, E. (2007). 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Cancer Lett. *249*, 271–282.

Boisdron-Celle, M., Morel, A., and Gamelin, E. (2010). Déficits en dihydropyrimidine déshydrogénase et toxicité aux fluoropyrimidines. Annales de Biologie Clinique *68*, 27–32.

Boyer, J.-C., Etienne-Grimaldi, M.-C., Thomas, F., Quaranta, S., Picard, N., Loriot, M.-A., Poncet, D., Gagnieu, M.-C., Ged, C., Broly, F., et al. (2014). Interest of UGT1A1 genotyping within digestive cancers treatment by irinotecan. Bulletin du Cancer 533–553.

Branda, R.F., Brooks, E.M., Chen, Z., Naud, S.J., and Nicklas, J.A. (2002). Dietary modulation of mitochondrial DNA deletions and copy number after chemotherapy in rats. Mutat. Res. *501*, 29–36.

Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2014). Colorectal cancer. The Lancet 383, 1490–1502.

Burke, P.J. (2017). Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. Trends in Cancer 3, 857–870.

Burté, F., Carelli, V., Chinnery, P.F., and Yu-Wai-Man, P. (2014). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. Nature Reviews Neurology *11*, 11.

Campbell, J.M., Stephenson, M.D., Bateman, E., Peters, M.D.J., Keefe, D.M., and Bowen, J.M. (2017). Irinotecan-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and metaanalyses. Pharmacogenomics J. *17*, 21–28.

Chabot, G.G., Robert, J., Lokiec, F., and Canal, P. (1998). [Irinotecan pharmacokinetics]. Bull Cancer *Spec No*, 11–20.

Choumar, A., Tarhuni, A., Lettéron, P., Reyl-Desmars, F., Dauhoo, N., Damasse, J., Vadrot, N., Nahon, P., Moreau, R., Pessayre, D., et al. (2011). Lipopolysaccharide-induced mitochondrial DNA depletion. Antioxid. Redox Signal. *15*, 2837–2854.

Claros, M.G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F.A., Popot, J.-L., and Jacq, C. (1995). Limitations to in vivo Import of Hydrophobic Proteins into Yeast Mitochondria. The Case of a Cytoplasmically Synthesized

Apocytochrome b. European Journal of Biochemistry 228, 762–771.

Clayton, D.A. (1984). Transcription of the mammalian mitochondrial genome. Annu. Rev. Biochem. 53, 573–594.

Conley, K.E. (1994). Cellular energetics during exercise. Adv Vet Sci Comp Med 38A, 1-39.

Costa, M.L.V., Lima-Júnior, R.C.P., Aragão, K.S., Medeiros, R.P., Marques-Neto, R.D., de Sá Grassi, L., Leite, L.L., Nunes, L.G., de Mesquita Neto, J.W.B., de Castro Brito, G.A., et al. (2014). Chemotherapy-associated steatohepatitis induced by irinotecan: a novel animal model. Cancer Chemother Pharmacol *74*, 711–720.

Cover, C., Mansouri, A., Knight, T.R., Bajt, M.L., Lemasters, J.J., Pessayre, D., and Jaeschke, H. (2005). Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. J. Pharmacol. Exp. Ther. *315*, 879–887.

Cremolini, C., Loupakis, F., Antoniotti, C., Lupi, C., Sensi, E., Lonardi, S., Mezi, S., Tomasello, G., Ronzoni, M., Zaniboni, A., et al. (2015). FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. Lancet Oncol. *16*, 1306–1315.

Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., et al. (2004). Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine *351*, 337–345.

Demeilliers, C., Maisonneuve, C., Grodet, A., Mansouri, A., Nguyen, R., Tinel, M., Lettéron, P., Degott, C., Feldmann, G., Pessayre, D., et al. (2002). Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. Gastroenterology *123*, 1278–1290.

Deschamps, D., DeBeco, V., Fisch, C., Fromenty, B., Guillouzo, A., and Pessayre, D. (1994). Inhibition by perhexiline of oxidative phosphorylation and the beta-oxidation of fatty acids: possible role in pseudoalcoholic liver lesions. Hepatology *19*, 948–961.

Diasio, R.B., and Harris, B.E. (1989). Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Clin Pharmacokinet *16*, 215–237.

DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Servidei, S., DeVivo, D.C., and Schon, E.A. (1987). Mitochondrial myopathies. J. Inherit. Metab. Dis. *10 Suppl 1*, 113–128.

Dodds, H.M., and Rivory, L.P. (1999). The mechanism for the inhibition of acetylcholinesterases by irinotecan (CPT-11). Mol. Pharmacol. *56*, 1346–1353.

Dong, D., Ako, R., Hu, M., and Wu, B. (2012). Understanding Substrate Selectivity of Human UDPglucuronosyltransferases through QSAR modeling and analysis of homologous enzymes. Xenobiotica 42, 808–820.

Du, K., Ramachandran, A., McGill, M.R., Mansouri, A., Asselah, T., Farhood, A., Woolbright, B.L., Ding, W.-X., and Jaeschke, H. (2017). Induction of mitochondrial biogenesis protects against acetaminophen hepatotoxicity. Food and Chemical Toxicology *108*, 339–350.

Eder, J.P., Chan, V., Wong, J., Wong, Y.W., Ara, G., Northey, D., Rizvi, N., and Teicher, B.A. (1998). Sequence effect of irinotecan (CPT-11) and topoisomerase II inhibitors in vivo. Cancer Chemotherapy and Pharmacology *42*, 327–335.

Etienne, M.C., Lagrange, J.L., Dassonville, O., Fleming, R., Thyss, A., Renée, N., Schneider, M., Demard, F., and Milano, G. (1994). Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. JCO *12*, 2248–2253.

Etienne-Grimaldi, M.-C., Boyer, J.-C., Beroud, C., Mbatchi, L., Kuilenburg, A. van, Bobin-Dubigeon,
C., Thomas, F., Chatelut, E., Merlin, J.-L., Pinguet, F., et al. (2017). New advances in DPYD genotype and risk of severe toxicity under capecitabine. PLOS ONE *12*, e0175998.

Feldmann, G., Haouzi, D., Moreau, A., Durand-Schneider, A.M., Bringuier, A., Berson, A., Mansouri, A., Fau, D., and Pessayre, D. (2000). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. Hepatology *31*, 674–683.

Ferguson, L.R. (1998). Inhibitors of topoisomerase II enzymes: a unique group of environmental mutagens and carcinogens. Mutat. Res. 400, 271–278.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., and Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. International Journal of Cancer *144*, 1941–1953.

Fernandez, F.G., Ritter, J., Goodwin, J.W., Linehan, D.C., Hawkins, W.G., and Strasberg, S.M. (2005). Effect of Steatohepatitis Associated with Irinotecan or Oxaliplatin Pretreatment on Resectability of Hepatic Colorectal Metastases. Journal of the American College of Surgeons *200*, 845–853.

Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. Circulation *115*, 2540–2548.

Fiorese, C.J., Schulz, A.M., Lin, Y.-F., Rosin, N., Pellegrino, M.W., and Haynes, C.M. (2016). The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR. Curr. Biol. *26*, 2037–2043.

Foschini, M.P., Macchia, S., Losi, L., Dei Tos, A.P., Pasquinelli, G., Di Tommaso, L., Del Duca, S., Roncaroli, F., and Dal Monte, P.R. (1998). Identification of mitochondria in liver biopsies. A study by immunohistochemistry, immunogold and Western blot analysis. Virchows Arch. *433*, 267–273.

Freudenreich, C.H., and Kreuzer, K.N. (1994). Localization of an aminoacridine antitumor agent in a type II topoisomerase-DNA complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *91*, 11007–11011.

Fromenty, B. (2010). Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments : mécanismes et conséquences au niveau du foie. Réanimation 19, 552–567.

Fromenty, B., and Pessayre, D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. Pharmacology & Therapeutics 67, 101–154.

Funk, J.A., Odejinmi, S., and Schnellmann, R.G. (2010). SRT1720 induces mitochondrial biogenesis and rescues mitochondrial function after oxidant injury in renal proximal tubule cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. *333*, 593–601.

Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2012). Mitochondria: master regulators of danger signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 780–788.

Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Ali, R.A., Ibrahim, N.M., and Ahmadiani, A. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. CNS Neuroscience & Therapeutics 23, 5–22.

Gramont, A. de, Krulik, M., Cady, J., Lagadec, B., Maisani, J.-E., Loiseau, J.-P., Grange, J.-D., Gonzalez-Canali, G., Demuynck, B., Louvet, C., et al. (1988). High-dose folinic acid and 5-fluorouracil bolus and continuous infusion in advanced colorectal cancer. European Journal of Cancer and Clinical Oncology 24, 1499–1503.

Guichard, S., Hennebelle, I., Bugat, R., and Canal, P. (1998). Cellular interactions of 5-fluorouracil and the camptothecin analogue CPT-11 (irinotecan) in a human colorectal carcinoma cell line. Biochemical Pharmacology *55*, 667–676.

Gupta, E., Lestingi, T.M., Mick, R., Ramirez, J., Vokes, E.E., and Ratain, M.J. (1994). Metabolic Fate of Irinotecan in Humans: Correlation of Glucuronidation with Diarrhea. Cancer Res *54*, 3723–3725.

Harris, B.E., Song, R.L., He, Y.J., Soong, S.J., and Diasio, R.B. (1988). Circadian rhythm of rat liver dihydropyrimidine dehydrogenase. Possible relevance to fluoropyrimidine chemotherapy. Biochem. Pharmacol. *37*, 4759–4762.

Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Pleven, E., and Scheiner, J. (1957). Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. Nature *179*, 663.

Hertzberg, R.P., Caranfa, M.J., and Hecht, S.M. (1989). On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. Biochemistry 28, 4629–4638.

Hoff, P.M., Ansari, R., Batist, G., Cox, J., Kocha, W., Kuperminc, M., Maroun, J., Walde, D., Weaver, C., Harrison, E., et al. (2001). Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. J. Clin. Oncol. *19*, 2282–2292.

Holt, I.J., Lorimer, H.E., and Jacobs, H.T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. Cell *100*, 515–524.

Huisman, S.A., de Bruijn, P., Ghobadi Moghaddam-Helmantel, I.M., IJzermans, J.N.M., Wiemer, E.A.C., Mathijssen, R.H.J., and de Bruin, R.W.F. (2016). Fasting protects against the side effects of irinotecan treatment but does not affect anti-tumour activity in mice. Br. J. Pharmacol. *173*, 804–814.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N. Engl. J. Med. *350*, 2335–2342.

Iyer, L., King, C.D., Whitington, P.F., Green, M.D., Roy, S.K., Tephly, T.R., Coffman, B.L., and Ratain, M.J. (1998). Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. J. Clin. Invest. *101*, 847–854.

Iyer, L., Das, S., Janisch, L., Wen, M., Ramírez, J., Karrison, T., Fleming, G.F., Vokes, E.E., Schilsky, R.L., and Ratain, M.J. (2002). UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. Pharmacogenomics J. *2*, 43–47.

Jensen, S.A., and Sørensen, J.B. (2012). 5-fluorouracil-based therapy induces endovascular injury having potential significance to development of clinically overt cardiotoxicity. Cancer Chemother. Pharmacol. *69*, 57–64.

Jornayvaz, F.R., and Shulman, G.I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. Essays Biochem. 47, 69–84.

Kasamatsu, H., Grossman, L.I., Robberson, D.L., Watson, R., and Vinograd, J. (1974). The replication and structure of mitochondrial DNA in animal cells. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *38*, 281–288.

Kawato, Y., Aonuma, M., Hirota, Y., Kuga, H., and Sato, K. (1991). Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. Cancer Res. *51*, 4187–4191.

Koch, O.R., De Leo, M.E., Borrello, S., Palombini, G., and Galeotti, T. (1994). Ethanol treatment upregulates the expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase in rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 1356–1365.

Koenig, H., and Patel, A. (1970). Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. The role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. Arch. Neurol. 23, 155–160.

Kunkel, G.H., Kunkel, C.J., Ozuna, H., Miralda, I., and Tyagi, S.C. (2019). TFAM overexpression

reduces pathological cardiac remodeling. Mol. Cell. Biochem. 454, 139–152.

Larosche, I., Letteron, P., Fromenty, B., Vadrot, N., Abbey-Toby, A., Feldmann, G., Pessayre, D., and Mansouri, A. (2007). Tamoxifen Inhibits Topoisomerases, Depletes Mitochondrial DNA, and Triggers Steatosis in Mouse Liver. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics *321*, 526–535.

Larosche, I., Lettéron, P., Berson, A., Fromenty, B., Huang, T.-T., Moreau, R., Pessayre, D., and Mansouri, A. (2010). Hepatic mitochondrial DNA depletion after an alcohol binge in mice: probable role of peroxynitrite and modulation by manganese superoxide dismutase. J. Pharmacol. Exp. Ther. *332*, 886–897.

Launay, M., Ciccolini, J., Fournel, C., Blanquicett, C., Dupuis, C., Fakhry, N., Duffaud, F., Salas, S., and Lacarelle, B. (2017). UPFRONT DPD DEFICIENCY DETECTION TO SECURE 5-FU ADMINISTRATION: PART 2- APPLICATION TO HEAD-AND-NECK CANCER PATIENTS. Clin Cancer Drugs *4*, 122–128.

Layoun, M.E., Wickramasinghe, C.D., Peralta, M.V., and Yang, E.H. (2016). Fluoropyrimidine-Induced Cardiotoxicity: Manifestations, Mechanisms, and Management. Curr Oncol Rep *18*, 35.

Lecrenier, N., and Foury, F. (2000). New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. Gene 246, 37–48.

Lemaire, L., Malet-Martino, M.C., de Forni, M., Martino, R., and Lasserre, B. (1992). Cardiotoxicity of commercial 5-fluorouracil vials stems from the alkaline hydrolysis of this drug. Br J Cancer *66*, 119–127.

Lettéron, P., Sutton, A., Mansouri, A., Fromenty, B., and Pessayre, D. (2003). Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. Hepatology *38*, 133–140.

Liu, X., Cheng, D., Kuang, Q., Liu, G., and Xu, W. (2014). Association of UGT1A1*28 polymorphisms with irinotecan-induced toxicities in colorectal cancer: a meta-analysis in Caucasians. Pharmacogenomics J. *14*, 120–129.

Loriot, M.-A., Ciccolini, J., Thomas, F., Barin-Le-Guellec, C., Royer, B., Milano, G., Picard, N., Becquemont, L., Verstuyft, C., Narjoz, C., et al. (2018). Dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) et sécurisation des chimiothérapies à base de fluoropyrimidines : mise au point et recommandations nationales du GPCO-Unicancer et du RNPGx. Bulletin Du Cancer *105*, 397–407.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. *193*, 265–275.

MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., and Thompson, J.A. (1998). Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. Biochemistry *37*, 1613–1622.

Mahli, A., Saugspier, M., Koch, A., Sommer, J., Dietrich, P., Lee, S., Thasler, R., Schulze-Luehrmann, J., Luehrmann, A., Thasler, W.E., et al. (2017). ERK activation and autophagy impairment are central mediators of irinotecan-induced steatohepatitis. Gut gutjnl-2016-312485.

Mansouri, A. (2003). Tacrine inhibits topoisomerases and DNA synthesis to cause mitochondrial DNA depletion and apoptosis in mouse liver. Hepatology *38*, 715–725.

Mansouri, A., Gaou, I., Fromenty, B., Berson, A., Lettéron, P., Degott, C., Erlinger, S., and Pessayre, D. (1997). Premature oxidative aging of hepatic mitochondrial DNA in Wilson's disease. Gastroenterology *113*, 599–605.

Mansouri, A., Gaou, I., De Kerguenec, C., Amsellem, S., Haouzi, D., Berson, A., Moreau, A., Feldmann, G., Lettéron, P., Pessayre, D., et al. (1999). An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic

mitochondrial DNA in mice. Gastroenterology 117, 181–190.

Mansouri, A., Gattolliat, C.-H., and Asselah, T. (2018). Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. Gastroenterology *155*, 629–647.

Massart, J., Begriche, K., Moreau, C., and Fromenty, B. (2017). Role of nonalcoholic fatty liver disease as risk factor for drug-induced hepatotoxicity. J Clin Transl Res *3*, 212–232.

Masuda, N., Kudoh, S., and Fukuoka, M. (1996). Irinotecan (CPT-11): pharmacology and clinical applications. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 24, 3–26.

Mathieu, L., Lopes Costa, A., Le Bachelier, C., Slama, A., Lebre, A.-S., Taylor, R.W., Bastin, J., and Djouadi, F. (2016). Resveratrol attenuates oxidative stress in mitochondrial Complex I deficiency: Involvement of SIRT3. Free Radic. Biol. Med. *96*, 190–198.

McQuade, R.M., Stojanovska, V., Donald, E., Abalo, R., Bornstein, J.C., and Nurgali, K. (2016). Gastrointestinal dysfunction and enteric neurotoxicity following treatment with anticancer chemotherapeutic agent 5-fluorouracil. Neurogastroenterol. Motil. 28, 1861–1875.

Melo, M.L.P., Brito, G.A.C., Soares, R.C., Carvalho, S.B.L.M., Silva, J.V., Soares, P.M.G., Vale, M.L., Souza, M.H.L.P., Cunha, F.Q., and Ribeiro, R.A. (2008). Role of cytokines (TNF- α , IL-1 β and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. Cancer Chemotherapy and Pharmacology *61*, 775–784.

Meulendijks, D., Henricks, L.M., Jacobs, B.A.W., Aliev, A., Deenen, M.J., de Vries, N., Rosing, H., van Werkhoven, E., de Boer, A., Beijnen, J.H., et al. (2017). Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity. British Journal of Cancer *116*, 1415–1424.

Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., and Attardi, G. (1982). Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *79*, 7195–7199.

Mosseri, M., Fingert, H.J., Varticovski, L., Chokshi, S., and Isner, J.M. (1993). In Vitro Evidence That Myocardial Ischemia Resulting from 5-Fluorouracil Chemotherapy Is Due to Protein Kinase C-mediated Vasoconstriction of Vascular Smooth Muscle. Cancer Res *53*, 3028–3033.

Mottis, A., Jovaisaite, V., and Auwerx, J. (2014). The mitochondrial unfolded protein response in mammalian physiology. Mamm. Genome 25, 424–433.

Nabiev, I., Fleury, F., Kudelina, I., Pommier, Y., Charton, F., Riou, J.F., Alix, A.J., and Manfait, M. (1998). Spectroscopic and biochemical characterisation of self-aggregates formed by antitumor drugs of the camptothecin family: their possible role in the unique mode of drug action. Biochem. Pharmacol. *55*, 1163–1174.

Nargund, A.M., Pellegrino, M.W., Fiorese, C.J., Baker, B.M., and Haynes, C.M. (2012). Mitochondrial Import Efficiency of ATFS-1 Regulates Mitochondrial UPR Activation. Science *337*, 587–590.

Nilakantan, V., Halligan, N.L.N., Nguyen, T.K., Hilton, G., Khanna, A.K., Roza, A.M., Johnson, C.P., Adams, M.B., Griffith, O.W., and Pieper, G.M. (2005). Post-translational modification of manganese superoxide dismutase in acutely rejecting cardiac transplants: role of inducible nitric oxide synthase. J. Heart Lung Transplant. *24*, 1591–1599.

O'Dwyer, P.J., and Catalano, R.B. (2006). Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy. J. Clin. Oncol. *24*, 4534–4538.

Paule, B., and Brion, N. (2000). [Metastatic colorectal cancer: new therapeutics]. Presse Med 29, 1072–1077.

Pessayre, D., and Fromenty, B. (2005). NASH: a mitochondrial disease. J. Hepatol. 42, 928–940.

Pessayre, D., Berson, A., Fromenty, B., and Mansouri, A. (2001). Mitochondria in steatohepatitis. Semin. Liver Dis. 21, 57–69.

Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M.-A., Lettéron, P., Moreau, R., and Mansouri, A. (2012). Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. Drug Metabolism Reviews 44, 34–87.

Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nature Reviews Cancer 6, 789–802.

Rasbach, K.A., and Schnellmann, R.G. (2007). PGC-1alpha over-expression promotes recovery from mitochondrial dysfunction and cell injury. Biochem. Biophys. Res. Commun. *355*, 734–739.

Rehman, H., Krishnasamy, Y., Haque, K., Thurman, R.G., Lemasters, J.J., Schnellmann, R.G., and Zhong, Z. (2014). Green tea polyphenols stimulate mitochondrial biogenesis and improve renal function after chronic cyclosporin a treatment in rats. PLoS ONE *8*, e65029.

Ribeiro, R.A., Wanderley, C.W.S., Wong, D.V.T., Mota, J.M.S.C., Leite, C.A.V.G., Souza, M.H.L.P., Cunha, F.Q., and Lima-Júnior, R.C.P. (2016). Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. Cancer Chemotherapy and Pharmacology *78*, 881–893.

Robert, J., and Rivory, L. (1998). Pharmacology of irinotecan. Drugs Today 34, 777-803.

Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J.-P., and Letellier, T. (2003). Mitochondrial threshold effects. Biochem. J. *370*, 751–762.

Rougier, P., and Lepère, C. (2005). Metastatic colorectal cancer: first- and second-line treatment in 2005. Semin. Oncol. 32, 15–20.

Russell, A.P., Feilchenfeldt, J., Schreiber, S., Praz, M., Crettenand, A., Gobelet, C., Meier, C.A., Bell, D.R., Kralli, A., Giacobino, J.-P., et al. (2003). Endurance Training in Humans Leads to Fiber Type-Specific Increases in Levels of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α in Skeletal Muscle. Diabetes *52*, 2874–2881.

Sandhu, J., Lavingia, V., and Fakih, M. (2019). Systemic treatment for metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. Journal of Surgical Oncology *119*, 564–582.

Santos, A., Zanetta, S., Cresteil, T., Deroussent, A., Pein, F., Raymond, E., Vernillet, L., Risse, M.-L., Boige, V., Gouyette, A., et al. (2000). Metabolism of Irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in Humans. Clin Cancer Res *6*, 2012–2020.

Sawano, T., Shimizu, T., Yamada, T., Nanashima, N., Miura, T., Morohashi, S., Kudo, D., Hui, F.M., Kijima, H., Hakamada, K., et al. (2015). Fatty acid synthase-positive hepatocytes and subsequent steatosis in rat livers by irinotecan. ONCOLOGY REPORTS 10.

Scarpulla, R.C. (2008). Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1147*, 321–334.

Schmiegel, W., Reinacher-Schick, A., Arnold, D., Kubicka, S., Freier, W., Dietrich, G., Geißler, M., Hegewisch-Becker, S., Tannapfel, A., Pohl, M., et al. (2013). Capecitabine/irinotecan or capecitabine/oxaliplatin in combination with bevacizumab is effective and safe as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: a randomized phase II study of the AIO colorectal study group. Ann. Oncol. *24*, 1580–1587.

Sommer, J., Mahli, A., Freese, K., Schiergens, T.S., Kuecuekoktay, S., Teufel, A., Thasler, W.E., Müller, M., Bosserhoff, A.K., and Hellerbrand, C. Analysis of molecular mechanisms of 5-fluorouracilinduced steatosis and inflammation in vitro and in mice. 14.

Sparreboom, A., Jonge, M.J. de, Bruijn, P. de, Brouwer, E., Nooter, K., Loos, W.J., Alphen, R.J. van,

Mathijssen, R.H., Stoter, G., and Verweij, J. (1998). Irinotecan (CPT-11) metabolism and disposition in cancer patients. Clin Cancer Res *4*, 2747–2754.

Staveren, M.C. van, Kuilenburg, A.B.P. van, Guchelaar, H.-J., Meijer, J., Punt, C.J.A., Jong, R.S. de, Gelderblom, H., and Maring, J.G. (2016). Evaluation of an oral uracil loading test to identify DPD-deficient patients using a limited sampling strategy. British Journal of Clinical Pharmacology *81*, 553–561.

Taanman, J.W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochim. Biophys. Acta *1410*, 103–123.

Tiraby, C., and Langin, D. (2005). PGC-1 α , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme. Med Sci (Paris) 21, 49–54.

Toshimoto, K., Tomaru, A., Hosokawa, M., and Sugiyama, Y. (2017). Virtual Clinical Studies to Examine the Probability Distribution of the AUC at Target Tissues Using Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling: Application to Analyses of the Effect of Genetic Polymorphism of Enzymes and Transporters on Irinotecan Induced Side Effects. Pharm. Res. *34*, 1584–1600.

Van Cutsem, E., Hoff, P.M., Blum, J.L., Abt, M., and Osterwalder, B. (2002). Incidence of cardiotoxicity with the oral fluoropyrimidine capecitabine is typical of that reported with 5-fluorouracil. Ann Oncol *13*, 484–485.

Van Cutsem, E., Labianca, R., Bodoky, G., Barone, C., Aranda, E., Nordlinger, B., Topham, C., Tabernero, J., André, T., Sobrero, A.F., et al. (2009). Randomized Phase III Trial Comparing Biweekly Infusional Fluorouracil/Leucovorin Alone or With Irinotecan in the Adjuvant Treatment of Stage III Colon Cancer: PETACC-3. JCO 27, 3117–3125.

Vanhoefer, U., Harstrick, A., Achterrath, W., Cao, S., Seeber, S., and Rustum, Y.M. (2001). Irinotecan in the Treatment of Colorectal Cancer: Clinical Overview. JCO *19*, 1501–1518.

Vauthey, J.-N., Pawlik, T.M., Ribero, D., Wu, T.-T., Zorzi, D., Hoff, P.M., Xiong, H.Q., Eng, C., Lauwers, G.Y., Mino-Kenudson, M., et al. (2006). Chemotherapy Regimen Predicts Steatohepatitis and an Increase in 90-Day Mortality After Surgery for Hepatic Colorectal Metastases. Journal of Clinical Oncology *24*, 2065–2072.

Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T., and Sim, G.A. (1966). Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from Camptotheca acuminata1,2. J. Am. Chem. Soc. *88*, 3888–3890.

Wallace, D.C., Brown, M.D., and Lott, M.T. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. Gene 238, 211–230.

Wasserman, E., Myara, A., Lokiec, F., Goldwasser, F., Trivin, F., Mahjoubi, M., Misset, J.L., and Cvitkovic, E. (1997). Severe CPT-11 toxicity in patients with Gilbert's syndrome: two case reports. Ann. Oncol. *8*, 1049–1051.

Wu, M.H., Yan, B., Humerickhouse, R., and Dolan, M.E. (2002). Irinotecan activation by human carboxylesterases in colorectal adenocarcinoma cells. Clin. Cancer Res. *8*, 2696–2700.

Xu, G., Zhang, W., Ma, M.K., and McLeod, H.L. (2002). Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan. Clin. Cancer Res. 8, 2605–2611.

Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., and Woese, C.R. (1985). Mitochondrial origins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4443–4447.

Yokokura, T., Sawada, S., Nokata, K., Miyasaka, T., and Mutai, M. (1981). Antileukemic activity of new camptothecin derivatives. In Proceedings of the Japanese Cancer Association, 40th Annual

Meeting, Sapporo, Japan, p.

Yu, H., Pan, W., Huang, H., Chen, J., Sun, B., Yang, L., and Zhu, P. (2019). Screening Analysis of Sirtuins Family Expression on Anti-Inflammation of Resveratrol in Endothelial Cells. Med. Sci. Monit. *25*, 4137–4148.

Zorzi, D., Laurent, A., Pawlik, T.M., Lauwers, G.Y., Vauthey, J.-N., and Abdalla, E.K. (2007). Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. BJS *94*, 274–286.

Résumé

Le 5-Fluorouracile et l'Irinotécan sont deux anticancéreux utilisés, en association, dans le traitement des cancers colorectaux. Ces molécules sont responsables d'une stéatohépatite, mais le mécanisme de la stéatose initiale n'est pas connu. Mon hypothèse de travail a été que ces médicaments pourraient inhiber la synthèse de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et la respiration mitochondriale, pouvant secondairement altérer la β -oxydation et favoriser le développement de la stéatose hépatique. Les effets hépatiques ont été étudiés *in vivo* chez des souris traitées quotidiennement 5 fois par semaine pendant un mois par 5-FU (50 mg/kg) ou par l'Irinotécan (100 mg/kg) ou par leur association sur l'histologie hépatique, l'ADNmt, la fonction mitochondriale et la dynamique mitochondriale. L'administration prolongée du 5-FU, de l'Irinotécan ou de leur association, augmente le stress oxydant mitochondrial, induit une stéatose et une fibrose hépatiques, et diminue respectivement les taux de l'ADNmt. Ces traitements diminuent également l'expression de la sous-unité 1 de la cytochrome *c* oxydase (complexe IV) codée par l'ADNmt, et altèrent la biogénèse mitochondriale et la mitophagie au niveau hépatique. Ces effets combinés pourraient secondairement inhiber la β -oxydation des acides gras et expliquer le développement des stéatoses hépatiques chez les patients traités.

Mots clés : Irinotécan, 5-Fluorouracile, hépatotoxicité, stéatohépatite, foie

Abstract

5-Fluorouracil and Irinotecan are two anti-cancer drugs used, in combination, in the treatment of colorectal cancers. These molecules are responsible for steatohepatitis, but the mechanism of the initial steatosis is unknown. The objective of this project is to study whether these drugs could inhibit the synthesis of mitochondrial DNA (mtDNA) and inhibit mitochondrial respiration, which may secondarily alter β -oxidation and promote the development of fatty liver. The effect of these drugs on the liver was analyzed individually or in combination *in vivo*. To this end the mice were treated 5 times per week during 4 weeks with 5-FU (50 mg/kg) and/or Irinotécan (100 mg/kg). Then, liver histology, mtDNA, mitochondrial function and mitochondrial dynamics have been analyzed. Our results show that prolonged administrations of 5-FU, Irinotecan or their combination increase mitochondrial oxydative stress, induce hepatic steatosis and fibrosis, and decrease mtDNA levels. These treatments also lower the expression of cytochrome *c* oxidase subunit 1 (complex IV) encoded by mtDNA, and alter mitochondrial biogenesis and mitophagy in the liver. These combined effects could secondarily inhibit the β -oxidation of fatty acids and explain the development of hepatic steatosis in treated patients.