MEMOIRE DE DIPLOME INTER UNIVERSITAIRE DE TABACOLOGIE

Evaluation du rôle possible des β-carbolines de la fumée du tabac dans l'inhibition des récepteurs de la Mono-Amine-Oxydase-A

Universités Paris 11 et Paris 12

Docteur Gilles Tachon 2009/2010

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Christian Trichard, qui m'a fait confiance en me confiant les résultats de ses travaux ainsi que ceux de ses collaborateurs.

Je remercie également le Dr Jean-luc Martinot.

Je remercie le Dr Nathalie Debbas, de la société Medi-Axe qui m'a aidé pour la partie Biométrie et Statistique.

Docteur Gilles Tachon

Médecin généraliste

1 rue André Maginot – 91400 – ORSAY

Téléphone : 01 69 07 31 65 et 06 78 49 08 18

Email : g.tachon@free.fr

Evaluation du rôle possible des Béta-carbolines de la fumée du tabac dans l'inhibition des récepteurs de la Mono-Amine-Oxydase-A

Introduction

Certains composants de la fumée du tabac ont une activité inhibitrice sur les deux isoformes A et B de l'enzyme Mono-Amine-Oxydase (MAO). Cette inhibition a, à ce jour, été très peu étudiée in vivo. A notre connaissance, seules deux études chez le fumeur, dont une spécifiquement dédiée à l'exploration cérébrale de la MAO-A, ont été publiées.

Dans une première étude, Fowler et al.[1] ont mis en évidence une réduction importante de l'activité de la MAO-A dans différentes zones du cerveau suite à l'inhalation de fumée de tabac, en utilisant la [11C]Clorgyline et la Tomographie par Emission de Positrons (TEP). En effet cette réduction a été de 22% dans les ganglions de la base. Elle l'a été de 38% dans le cortex occipital.

Dans une seconde étude plus récente, en 2009, Leroy et al.[2], en utilisant la [^{11}C]Béfloxatone et la TEP, ont montré une réduction plus importante encore de l'activité de la MAO-A dans les aires corticales, de l'ordre de 60% en moyenne chez les fumeurs, avec une diminution moindre, de l'ordre de 40% ,dans les aires sous corticales. Les résultats de cette étude sont présentés, avec l'autorisation des auteurs, afin d'illustrer le propos de ce mémoire dans le Tableau 1

Dans l'étude de Leroy et al. [2], l'affinité des récepteurs MAO-A pour la [^{11}C]Befloxatone de différentes aires cérébrales s'est trouvée modifiée dans le groupe fumeurs chroniques suite à l'inhalation de fumée de tabac, par rapport au groupe non fumeur.

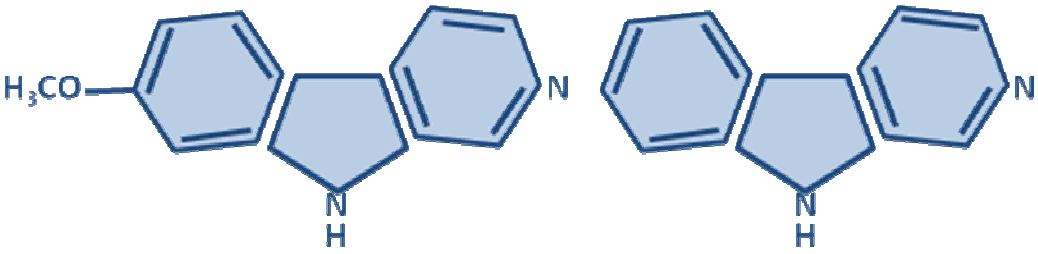
Tableau 1 : comparaison de l'affinité de la [^{11}C]Béfloxatone, pour les récepteurs MAO-A dans différentes aires cérébrales, entre sujets fumeurs et non fumeurs.

	Affinité			
Région cérébrale	**Non-fumeurs (moyenne ± SD)**	**Fumeurs (moyenne ± SD)**	**Différences (%)**	***P***
Cortex cingulaire	32,2 ± 13,1	13,8 ± 3,1	-57%	0,004
Cortex frontal	28,4 ± 12,0	11,6 ± 2,6	-59%	0,004
Cortex occipital	30,1 ± 12,1	12,5 ± 2,6	-59%	0,003
cervelet	14,9 ± 5,8	6,0 ± 1,5	-60%	0,006
Noyau caudé	10,4 ± 4,4	6,1 ± 2,1	-41%	0,09
Putamen	16,9 ± 6,8	10,6 ± 3,5	-38%	0,15
Thalamus	12,1 ± 5,1	7,4 ± 2,3	-39%	0,09

Des travaux antérieurs réalisés par Herraiz et Chaparro.[3}, avaient mis en évidence l'action inhibitrice de certains composés du café, de façon compétitive et réversible sur les récepteurs MAO. Ces composés dénommés harmane et norharmane, sont des β-carbolines, qui appartiennent à la famille des alcaloïdes, et font partie des constituants de nombreuses plantes utilisées traditionnellement pour leurs propriétés pharmacologiques. Parmi ces dernières, leurs propriétés hallucinogènes ont été particulièrement exploitées par les indiens d'Amérique du Sud, ce qui a conduit de nombreux chercheurs à s'intéresser à elles. Elles sont constituées de deux représentants, le norharmane, et l'harmane, ce dernier se différenciant du précédent par la présence d'un radical méthyl supplémentaire (Figure 1).

Ces molécules furent initialement isolées à partir d'une plante nommée *Peganum Harmala*, dont on a tiré le nom harmane,4..

Figure 1 : illustration des β-carbolines, harmane et norharmane



Molécule d'harmane **Molécule de norharmane**

Pfau et Skog 5 ont recensé l'ensemble des nombreux travaux analytiques qui ont permis d'isoler les β-carbolines dans les plantes, ainsi que dans de nombreux dérivés des plantes, tel le café, le ketchup, la sauce soja, les écorces de céréales, le vin, la bière, le vinaigre. Leurs présences semblent moindres dans les spiritueux à l'exception du Saké. De nombreux aliments comme la viande rouge, la volaille ou le poisson, génèrent de plus ou moins grandes quantités de β-carbolines en fonction du mode de cuisson choisie. En effet, les concentrations augmentent avec la température de cuisson. Le tryptophane contenu dans ces aliments, associé au glucose à forte température, est responsable de la production de norharmane. Le tryptophane n'est pas le seul acide aminé conduisant à la production de β-carbolines, l'isoleucine, l'arginine, et la phénylalanine sont également impliquées dans la synthèse d'harmane et de norharmane.

L'absorption de tryptophane, ainsi que d'éthanol chez des fumeurs et également chez des non fumeurs, a permis d'observer une augmentation de la production de β-carbolines endogènes, aussi bien plasmatiques que dans les globules rouges

Cependant la contribution majeure de l'exposition de l'homme à l'harmane et au norharmane provient de la fumée du tabac où des taux de 12µg de norharmane et de 4µg d'harmane par gramme de condensa de fumée ont été retrouvés.[6]. De nombreux autres auteurs ont retrouvé des taux variables de β-carbolines dans les fumées de

tabac. L'harmane et le norharmane ont également été identifiés dans la fumée du chanvre indien [7.]

Les effets inhibiteurs de l'harmane et du norharmane, avaient permis d'établir le raisonnement suivant :

En inhibant l'activité des enzymes MAO-A et MAO-B, la dopamine étant moins catabolisée, les β-carbolines contenues dans la fumée de tabac pourraient agir comme agents protecteurs de certaines maladies dégénératives et notamment la maladie de Parkinson [8,9]. Il en est de même concernant les β-carbolines contenues dans le café sous forme de boisson. Ces hypothèses ont été largement étudiées et vérifiées, comme l'ont montré de nombreuses études épidémiologiques publiées entre 2000 et 2004[10,11,12,13,14,15]

L'objet de notre travail est, d'après l'étude publiée par Leroy et al, de tenter de relier les concentrations plasmatiques de β-carbolines à la variation d'affinité des récepteurs MAO-A pour la [^{11}C]Béfloxatone dans différentes aires cérébrales mesurées chez les sujets fumeurs et chez les sujets non fumeurs à l'aide de la TEP. De plus nous avons cherché à établir une corrélation entre les quantités de cigarettes quotidiennes consommées, déclarées par les sujets fumeurs et les taux plasmatiques d'harmane et de norharmane.

Matériels et méthodes

Sept sujets volontaires, fumeurs, d'au moins 10 cigarettes par jour depuis plus de 5 ans et 6 sujets volontaires non fumeurs ont été inclus dans l'étude. Tous les sujets ont signé un consentement, après avoir reçu les informations détaillées de l'étude. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique pour les recherches biomédicales de l'hôpital Bicêtre (le Kremlin Bicêtre).

A l'aide d'un appareil à résonance magnétique nucléaire décrit dans la publication de Leroy et al.[2], des images en trois dimensions utilisant une pondération T1 ont été

obtenues. Les sujets fumeurs devaient fumer une cigarette au cours des 30 à 45 minutes précédant une injection intraveineuse de la dose du traceur : la [^{11}C]béfloxatone.

Cette injection correspondait au temps T0 de la période de 60 minutes d'acquisition des images par TEP. Durant cette période d'acquisition, les prélèvements sanguins, en vue de déterminer les concentrations plasmatiques d'harmane et de norharmane, ont été effectués à T5 minutes, et T45 minutes.

La [^{11}C]béfloxatone est un agent d'imagerie médicale capable de se lier de façon réversible et sélective à la monoamine oxydase de type A.

La béfloxatone ou (5R)-5- (méthoxyméthyl)-3- est un inhibiteur sélectif, réversible et compétitif de la MAO-A dans le cerveau, le foie, le duodénum et le cœur, chez le rat et chez l'homme.

Actuellement, 3 traceurs de la MAO-A ont été développés. Deux ont une fixation irréversible : la [^{11}C]clorgyline et la [^{11}C]harmine. Au contraire, la fixation de la [^{11}C]béfloxatone est réversible.

La béfloxatone permet la détermination, de la distribution tissulaire de la MAO-A du corps humain dans une ou plusieurs régions de l'organisme, après une injection de [^{11}C]béfloxatone et la mesure de la concentration de radioactivité par TEP de cette ou ces régions

Au cours de son développement, les images tomographiques obtenues après administration de [^{11}C]béfloxatone ont révélé une distribution hétérogène de la radioactivité dans les différentes structures cérébrales[16]. Le thalamus fut la structure cérébrale qui présenta la fixation la plus importante de béfloxatone. Une fixation importante fut également retrouvée dans le putamen et dans les structures corticales. La fixation la plus faible fut observée dans le cervelet.

Statistiques

Nous avons retenu le coefficient de corrélation des rangs de Spearman afin de rechercher la présence d'une relation entre les taux d'harmane et de norharmane et l'affinité de la [^{11}C]béfloxatone pour les récepteurs MAO-A dans différentes aires cérébrales entre les sujets fumeurs et non fumeurs. A l'aide de ce test, nous avons recherché une corrélation entre les taux de ces β-carbolines et le nombre de cigarettes quotidiennes déclarées par les fumeurs.

Résultats

Les sujets fumeurs ne présentaient pas de différences significatives par rapport aux non fumeurs en ce qui concernait l'âge et le poids à l'entrée dans l'étude. Le Tableau 2 résume les caractéristiques des sujets à l'entrée dans l'étude.

Tableau 2 : Caractéristiques de la population à l'entrée dans l'étude.

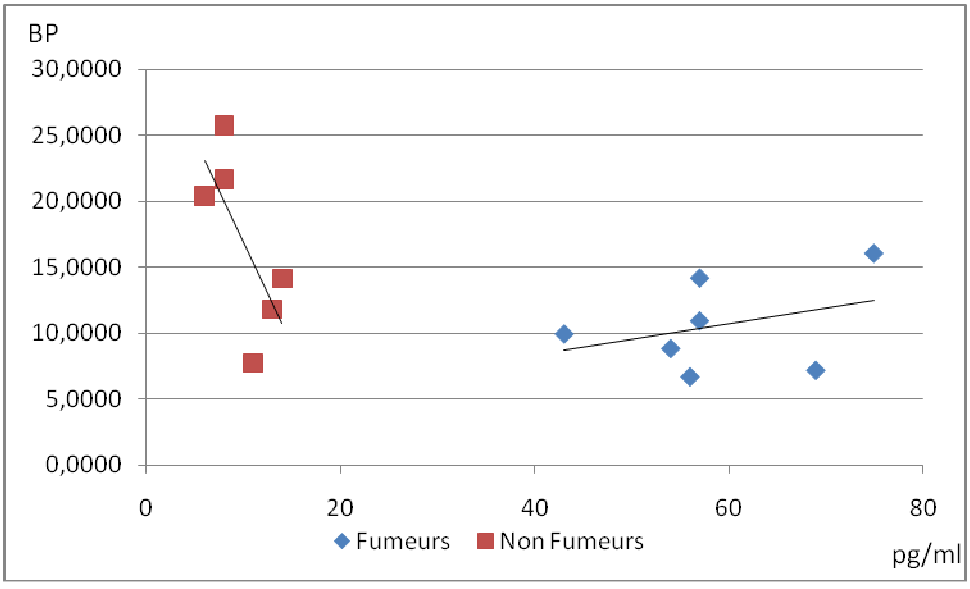
paramètres	Fumeurs	Non-fumeurs.
Age (années)	29,3 ± 7,9	26,3 ± 4,5
Poids (kg)	70,5 ± 9,8	71,6 ± 9,4
Nombre de cigarettes/jour	22,4 ± 9,6	NA
Ancienneté (années)	15,7 ± 7,7	NA
Fagerström	5,4 ± 2,8	NA

Nous avons recherché une relation possible entre les taux d'harmane et de norharmane et le degré d'affinité (BP) de la [^{11}C]béfloxatone pour les récepteurs MAO-A en fonction du statut de fumeur ou de non fumeur. Bien que les résultats ne soient pas statistiquement significatifs pour le test de corrélation de rangs de Spierman, on observe que chez les non fumeurs, plus les concentrations plasmatiques d'harmane et de norharmane sont élevées, moins l'affinité entre les récepteurs MAO-A et la

[^{11}C]béfloxatone est grande. Chez les fumeurs, l'inverse n'est pas tout à fait vrai, mais on observe une tendance, où plus les concentrations d'harmane et de norharmane sont élevées, plus l'affinité de la [^{11}C]béfloxatone avec les récepteurs MAO-A est élevée.

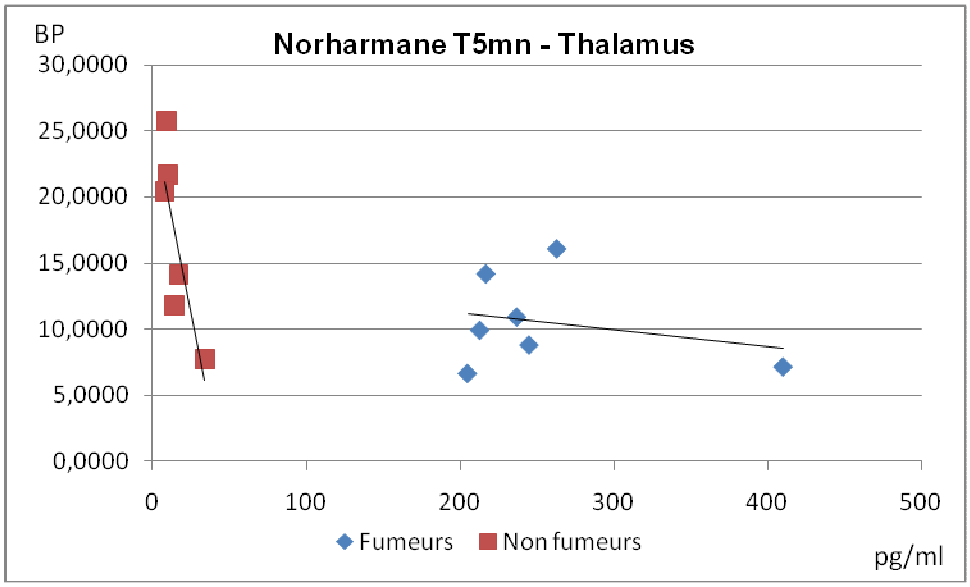
L'ensemble des graphiques et analyses statistiques est présenté en annexe de ce travail, mais à titre indicatif, nous présentons ici les résultats d'une des analyses de corrélations les plus représentatives, bien que statistiquement non significatives, elle reflète les résultats observés quelles que soient les régions du cerveau pour les concentrations d'harmane. A cette fin nous avons choisi la relation de l'harmane à T5 minutes. Dans ce graphique nous avons ajouté la représentation de la courbe de tendance linéaire des nuages de points qui illustrent cette tendance à une corrélation négative chez les non fumeurs et à l'opposé, une tendance à une corrélation plutôt positive chez les fumeurs.

Figure 2 : relation de l'affinité (BP) de la [^{11}C]béfloxatone pour les récepteurs MAO-A du thalamus et la concentration d'harmane.



La même présentation de l'analyse peut être également faite, concernant le norharmane, où la tendance chez les fumeurs montre que plus la concentration est élevée, plus l'affinité de la [^{11}C]béfloxatone avec les récepteurs est affaiblie (Figure 3).

Figure 3 : relation de l'affinité (BP) de la [^{11}C]béfloxatone pour les récepteurs MAO-A du thalamus et la concentration de norharmane.



Nous n'avons pas retenu les analyses concernant le cervelet, du fait des nombreuses données manquantes.

En ce qui concerne le taux plasmatique moyen de norharmane à T5 minutes soit 30 à 45 mn après avoir fumé une cigarette il était de 255,71 ± 70,97 pg/ml chez les fumeurs.

Dans le même temps, chez les non fumeurs, il était de 14,29 ± 9,32 pg/ml. A T45 minutes, les taux étaient descendus en moyenne à 120,29 ± 37,63 pg/ml chez les fumeurs; il n'a pas été remesuré à T45 minutes chez les non fumeurs.

En ce qui concerne les concentrations d'harmane chez les fumeurs, les taux moyens étaient de 58,71 ± 10,44 pg/ml à T5 minutes et de 9,71 ± 2,98 chez les non fumeurs. Le taux d'harmane diminuait à 42,57 ± 23,27 pg/ml à T45 minutes, chez les fumeurs.

Les Figure 4 et Figure 5 illustrent les valeurs individuelles au cours du temps des concentrations d'harmane et de norharmane chez les fumeurs.

Figure 4 : Concentrations plasmatiques de norharmane à T5 minutes et T45 minutes après l'injection de [^{11}C]béfloxatone, chez les sujets fumeurs.

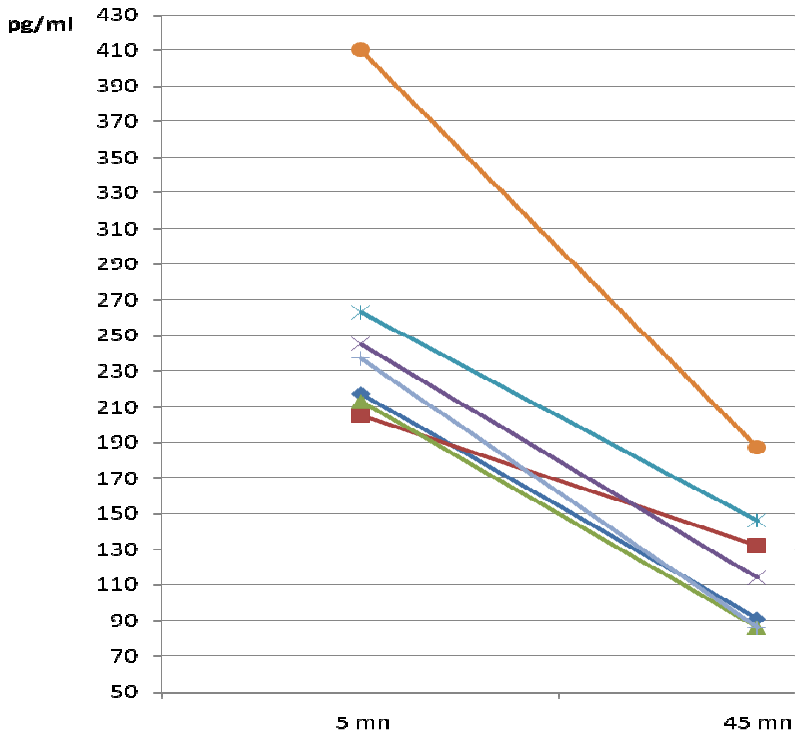
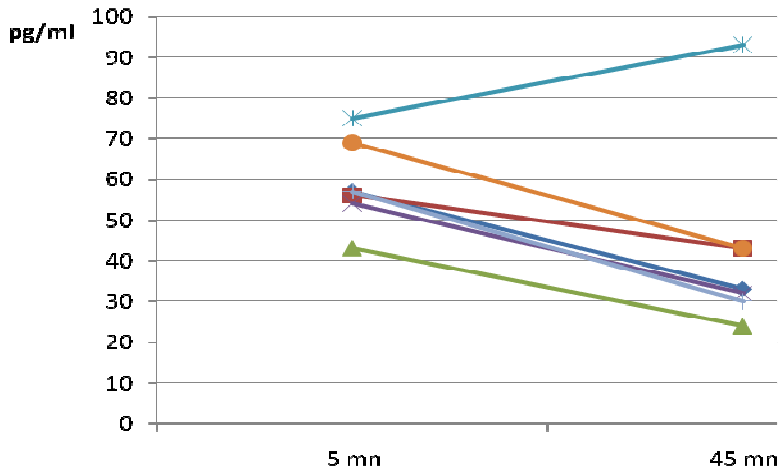


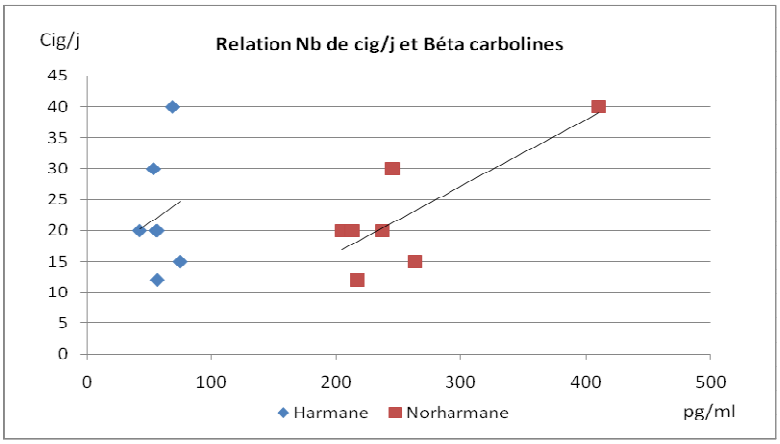
Figure 5 : Concentrations plasmatiques d'harmane, 5 minutes et 45 minutes après l'inhalation de la fumée d'une cigarette, chez les sujets fumeurs.



La recherche d'une relation entre les concentrations plasmatiques des β-carbolines et le nombre de cigarettes consommées par jour n'est pas statistiquement significative lorsque l'on utilise le coefficient de Spierman. La Figure 6 illustre cette relation. On observe qu'un des points est très à l'extérieur du nuage de points représenté, il s'agissait d'un patient qui consommait 40 cigarettes par jour.

Bien qu'il n'y ait pas de significativité statistique, les concentrations d'harmane et de norharmane semblent évoluer de façon parallèle aux nombres de cigarettes consommées par jour.

Figure 6 : nombre de cigarettes fumées par jour et concentrations plasmatiques de β-carbolines.



Discussion

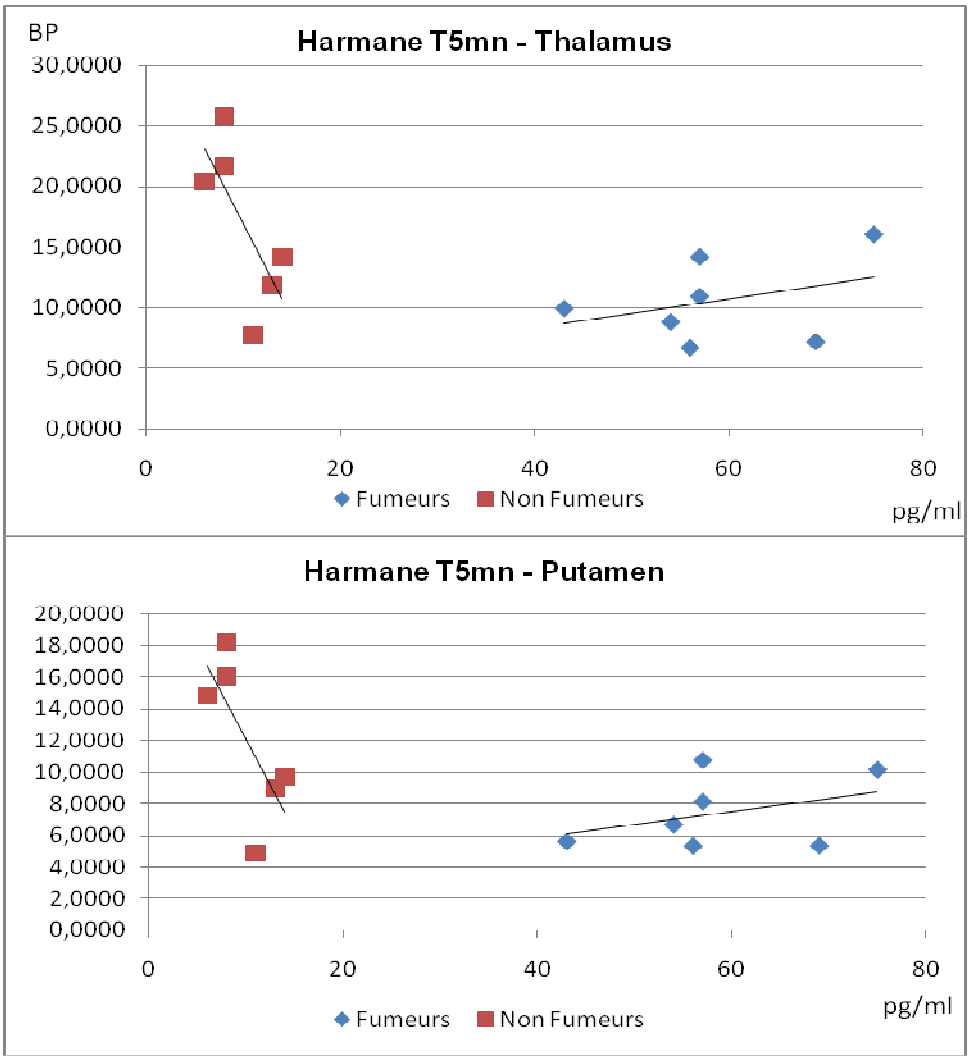
L'analyse des travaux publiés par Leroy et al, n'avait pas pris en compte les taux de β-carbolines analysés dans les prélèvements des sujets de l'étude. Compte tenu de la distribution non normale de l'échantillon, ainsi que de sa petite taille, nous avons retenu le coefficient de corrélation des rangs de Spearman afin de rechercher une possible relation.

De façon surprenante, bien que la relation entre les concentrations plasmatiques de norharmane et d'harmane avec l'affinité du substrat pour les récepteurs MAO-A ne soit jamais significative ces résultats vont à l'encontre des résultats observés dans la même étude, en ce sens que Leroy et al trouvaient que la disponibilité des récepteurs

de la MAO-A étaient réduite chez les fumeurs, laissant imaginer que plus les concentrations d'harmane seraient élevées, moins l'affinité des récepteurs à la MAO-A serait importante. Bien que cette tendance apparaisse pour le norharmane, il semble que cela soit dû à un point très différent des autres, correspondant à un fumeur de 40 cigarettes par jour, qui traduit une dispersion trompeuse.

Concernant la région du thalamus et celle du putamen, une relation purement visuelle les réunit, en effet les schémas des deux profils bien que se situant à des niveaux de BP différents paraissent visuellement identiques. (Figure 7)

Figure 7: Représentation des concentrations d'harmane en fonction de l'affinité des récepteurs MAO-A du thalamus et du putamen pour la [^{11}C]béfloxatone



Bien que les valeurs de BP soient différentes entre le putamen et le thalamus, le profil de la corrélation harmane T5 putamen est très superposable à celui de harmane T5 thalamus, avec une répartition du nuage de points tout à fait similaire. Cette superposition paraît simplement visuelle, et constitue une curiosité. Il serait tentant mais fantaisiste, de penser que la proximité anatomique des deux régions joue un rôle.

Les concentrations plasmatiques moyennes d'harmane et de norharmane observées dans notre étude, montrent des taux de norharmane plus élevés que ceux d'harmane.

Les fumeurs ont un taux de norharmane 5 fois plus élevé que celui des non fumeurs, alors que le taux d'harmane est seulement 2 fois plus élevé chez les fumeurs comparé aux non fumeurs.

Un écart important entre norharmane et harmane avait déjà été observé chez le rat [17], avec des différences selon les organes. Dans le foie les concentrations de norharmane étaient 37.7% plus importantes que celles d'harmane, et dans le plasma, les concentrations de norharmane étaient 72,3% plus importantes. Dans cette étude, seuls les reins avaient une concentration d'harmane de 40,4% supèrieure à celle du norharmane. D'autres auteurs cette fois chez l'homme, ont retrouvé de telles différences, comme le décrivent Pfau et skog [6] dans leur publication. Dans ces travaux, qu'il s'agisse du norharmane ou de l'harmane, les différences observées sont toujours du même ordre.

On observe également une décroissance des quantités de norharmane plus importante que celle d'harmane. Entre T5 minutes et T45 minutes, le pourcentage de décroissance de norharmane est de 53,0%, alors qu'il n'est que de 27,3% pour l'harmane au cours de la même période malgré une ½ vie d'élimination quasi équivalente, comme l'avait montré Rommelspacher et al.[18] avec un T max identique pour les deux molécules et une demi vie quasi similaire avec 51 mn pour le norharmane et 68,3 mn pour l'harmane.

On notera, qu'au niveau des données individuelles, un des sujets fumeurs consomme plus du double de la moyenne du groupe, avec une ancienneté bien supérieure, cette inhomogénéité des sujets quant à leur consommation de tabac est un des facteurs qui a probablement influencé ces résultats. On peut faire la même remarque quant à la sélection des non fumeurs où leur consommation alimentaire aurait du être prise en compte, compte tenu des variations importantes dans les concentrations d'harmane et de norharmane observées dans l'alimentation de tous les jours en particulier avec le café.

Conclusion

L'analyse des résultats des concentrations d'harmane et de norharmane n'a pas permis de démontrer l'existence d'un lien direct entre ces concentrations et le degré d'affinité de la [^{11}C]béfloxatone pour les récepteurs de la MAO-A. Compte tenu du faible nombre de sujets, et de l'absence de critères de sélection pertinents. Les tendances observées ne constituent en rien des conclusions définitives, puisqu'on s'attendait à des résultats inverses. Cela met en lumière l'importance de la réflexion méthodologique et la nécessité d'assurer un recrutement de sujets sur des critères de sélection adaptés à l'objectif principal de l'étude. Leroy et al [2], ont bâti leur étude pour étudier le rôle de la fumée du tabac chez des fumeurs par rapport à des non fumeurs et la disponibilité des récepteurs à la MAO-A. Leurs résultats ne peuvent pas être remis en question, par contre ils n'ont pas construit leur étude pour mesurer les effets de la concentration plasmatique de β-carbolines sur cette disponibilité. Cette idée reste cependant extrêmement intéressante à étudier, mais avec un nombre plus important de sujets ainsi qu'une sélection des sujets, tenant comte notamment de l'influence des apports exogènes de β-carbolines.

Références

1 Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, et al. Brain monoamine oxidase A inhibition in cigarette smokers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:14065-69.

2 Leroy C, Bragulat V, Berlin Y, Gregoire MC, Bottlaender M, Roumenov D, Dollé F, Bourgeois S, Penttila J, Artiges E, Martinot JC, Trichard C. Cerebral Monoamine Oxidase A Inhibition in Tobacco Smokers Confirmed With PET and [11C]Befloxatone. J Clin Psychopharmacol. 2009;29:86-88.

3 Herraiz T, Chaparro C. Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and β-carbolines norharman and harman isolated from coffee Life Sciences 2006 ;78 :795 – 802.

4 Picada JN, da Silva KV, Erdtmann B, Henriques AT, Henriques JA. [Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. Mutat Res. 1997;379:135-49.

5 Pfau W,.Skog K .Exposure to βcarbolines norharman and harman. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;802:115-26.

6 Totsuka Y, Ushiyama H, Ishihara J, Sinha R, Goto S, Sugimura T, Wakabayashi K. Quantification of the co-mutagenic beta-carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. Cancer Lett. 1999;143:139-43.

7 Kettenes-van den Bosch JJ, Salemink CA. Cannabis. XVI. Constituents of marihuana smoke condensate. J Chromatogr. 1977;131:422-4.

8 Fowler J.S., Logan J., Wang G.-J., Volkow N.D. Monoamine oxidase and cigarette smoking. Neurotoxicology 2003:24;75– 82.

9 Castagnoli K., Murugesan T. Tobacco leaf, smoke, and smoking, MAO inhibitors, Parkinson's disease and neuroprotection; are there links? Neurotoxicology 2004:25;279– 91.

10 Ascherio A., Zhang S.M., Hernan M.A., Kawachi I., Colditz G.A., Speizer F.E., Willett W.C. Prospective study of caffeine consumption andthe risk of Parkinson's disease in men and women. Annals of Neurology.2001:50;56– 63.

11 Benedetti M.D., Bower J.H., Maraganore D.M., McDonnell S.K., Peterson B.J., Ahlskog J.E., Schaid D.J., Rocca W.A. Smoking, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease: a case-control study.Neurology 2000:55;1350–58.

12 Hernan M.A., Takkouche B., Caaman˜o-Isorna F., Gestal-Otero J.J. 2002. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking and the risk of Parkinson's disease. Annals of Neurology 2002:52;276– 84.

13 Ragones P., Salemi G., Morgante L., Aridon P., Epifanio A., Buffa D., Scoppa F., Savettieri G. A case-control study on cigarette, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease. Neuroepidemiology 2003:22;297– 304.

14 Ross G.W., Abbott R.D., Petrovitch H., Morens D.M., Grandinetti A., Tung K.H., Tanner C.M., Masaki K.H., Blanchette P.L., Curb J.D., Popper J.S., White L.R. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson's disease. JAMA: The Journal of the American Medical Association 2000:283;2674–79.

15 Tanner C.M., Goldman S.M., Aston D.A., Ottman R., Ellenberg J., Mayeux R., Langston J.W. Smoking and Parkinson's disease in twins. Neurology 2002:58;581–88.

16 Saura J, Kettler R, Da Prada M, Richards J G. Quantitative enzyme radioautography with 3H-Ro41-1049 and 3H-Rol9-6327 in vitro : Localization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs and human brain, J. Neurosci. 1992;12:1977-99.

17 Rommelspacher H, May T, Salewski B. Harman (1-methyl-beta-carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. Eur J Pharmacol 1994;252:51-9.

18 Rommelspacher H, Meier-Henco M, Smolka M, Kloft C. The levels of norharman are high enough after smoking to affect monoamineoxidase B in platelets. Eur J Pharmacol. 2002;441:115-25.

ANNEXES

ANALYSES STATISTIQUES (12 pages)