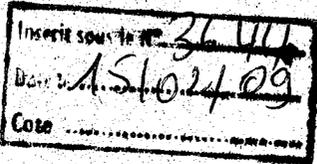


Doc

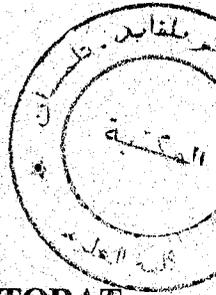
Doc 50

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT
EN
BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Présentée par

Mme BABA AHMED FATIMA ZOHRA

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES EFFETS DES N-ACYL-
2-HYDROXYMETHYL AZIRIDINES : - IN VIVO, ESSAIS DE
TOXICITE AIGUE. - IN VITRO, MODULATION DU
SYSTEME IMMUNITAIRE**

Soutenue le

, devant la commission d'examen :

Président	M.A Khellil	Professeur Univ. Tlemcen (Algérie)
Examineur	J. Belleville	Professeur Univ. Bourgogne (France)
Examineur	M.B Baba Hamed	Maître de Conférences Univ. Oran (Algérie)
Examineur	Z. Regainia	Professeur Univ. Annaba (Algérie)
Directeur de thèse	H. Merzouk	Professeur Univ. Tlemcen (Algérie)
Codirecteur de thèse	J.Kajima Mulengi	Professeur Univ. Tlemcen (Algérie)

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT
EN
BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE**

Présentée par

Mme BABA AHMED FATIMA ZOHRA

***CONTRIBUTION A L'ETUDE DES EFFETS DES N-ACYL-
2-HYDROXYMETHYL AZIRIDINES : - IN VIVO, ESSAIS DE
TOXICITE AIGUE. – IN VITRO, MODULATION DU
SYSTEME IMMUNITAIRE***

Soutenue le _____ **, devant la commission d'examen :**

Président	M.A Khellil	Professeur Univ. Tlemcen (Algérie)
Examineur	J. Belleville	Professeur Univ. Bourgogne (France)
Examineur	M.B Baba Hamed	Maître de Conférences Univ. Oran (Algérie)
Examineur	Z. Regainia	Professeur Univ. Annaba (Algérie)
Directeur de thèse	H. Merzouk	Professeur Univ. Tlemcen (Algérie)
Codirecteur de thèse	J.Kajima Mulengi	Professeur Univ. Tlemcen (Algérie)

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie **Madame MERZOUK H**, professeur à l'université de Tlemcen ma directrice de thèse, qui a guidé judicieusement ces recherches. Je garde en mémoire ses qualités d'encadrement et ses conseils bienveillants. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude. Je vous remercie pour m'avoir donné la chance de travailler avec vous sur un sujet aussi passionnant, d'être toujours présente et prête à aider vos étudiants, d'être rigoureuse et enthousiaste. Travailler sous votre direction était une très belle expérience. J'ai appris avec vous le goût de la recherche et l'ouverture d'esprit sur plusieurs domaines scientifiques. Je vous remercie également pour tous les précieux conseils que vous m'avez donné tout au long de cette thèse.

Je remercie chaleureusement **Monsieur KAJIMA MULENGI J**, professeur à l'université de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être co-directeur de thèse. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire COSNA, pour son écoute, son appui ainsi que pour son investissement dans ce travail. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

J'exprime toute ma reconnaissance à **Monsieur KHELLIL M.A**, professeur à l'Université de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je le remercie également pour sa compréhension. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je remercie également **Monsieur BELLEVILLE J**, professeur à l'Université de Bourgogne, d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mon entière reconnaissance.

Je remercie également **Monsieur BABA HAMED M.B**, Maître de Conférences à l'Université d'Oran, de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger et de faire partie du jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie également **Monsieur REGAINIA Z**, professeur à l'Université de Annaba, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Mes remerciements très particuliers vont à **Monsieur KARLIN D**, Docteur en virologie (Biologie moléculaire) et **Madame MATHIEU M**, Docteur en cancérologie INMED à l'université de Provence (AIX-MARSEILLE), pour l'aide qu'ils m'ont apportée au niveau de la partie expérimentale et leur disponibilité. Qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude.

Je remercie **Monsieur KENEDY H**, professeur et directeur de l'unité de recherche INSERM UNITE 846, à l'université Claude Bernard (Lyon) pour son aide technique, son dévouement ainsi que sa disponibilité.

Je remercie **Monsieur KHAN N.A**, professeur à l'université de Bourgogne pour l'aide qu'il m'a apportée au niveau de la partie expérimentale et sa disponibilité. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude.

Je remercie également, **Monsieur MERZOUK SA**, Maître de conférence au département de Physique, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, pour son aide dans l'étude statistique.

Mes remerciements vont à **Mr BOUZIANI SA**, Docteur en gynécologie au service de maternité du centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen, ainsi qu'aux femmes volontaires témoins et aux femmes atteintes d'un cancer du sein d'avoir accepté les prélèvements sanguins.

Enfin, je remercie tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

PUBLICATIONS

Ce travail a fait l'objet de quatre publications internationales :

MEDJAHED W, TABEL ZATLA A, KAJIMA MULENGI J, **BABA AHMED FZ**, MERZOUK H (2004)

The synthesis of N-acyl-2-hydroxymethyl aziridines of biological interest. **Tetrahedron Letters** 45: 1211-1213.

BABA AHMED FZ, MEDJAHED W, MERZOUK H, KAJIMA MULENGI J, BELLEVILLE J, PROST J (2006)

Effects of N-acyl-2-hydroxymethyl aziridines on in vitro proliferative responses of human lymphocytes stimulated by mitogens. **Gen Physiol Biophys** 25: 277-287.

BABA AHMED FZ, BOUANANE S, MERZOUK SA, MERZOUK H, MEDJAHED W, KAJIMA MULENGI J, PROST J (2008)

2-hydroxy-methyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine stimule la prolifération in vitro des lymphocytes humains et la sécrétion des interleukines. **Pathologie Biologie** 56: 137-142.

BABA AHMED FZ, BOUANANE S, MERZOUK SA, MERZOUK H, MEDJAHED W, KAJIMA MULENGI J (2008)

Effets des aziridines de synthèse sur la lymphoprolifération chez les personnes obèses. **J. ABB, applied biology and biotechnology**. In press.

COMMUNICATIONS

Deuxième FORUM sur la recherche en santé, 18 /06/2002. Faculté de Médecine, Tlemcen, Algérie.

BABA AHMED FZ, MERZOUK H, KAJIMA J, MEDJAHED W

Importance des substances chimiques contenant le noyau aziridine dans la modulation du système immunitaire.

Première journée sur la protection de l'environnement, le 28 et 29/05/2003. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Tlemcen, Algérie.

BABA AHAMED FZ, MERZOUK H, KAJIMA J.

Etude in vitro des substances chimiques contenant le noyau aziridine dans la modulation du système immunitaire.

Quatrième Journée de Chimie, le 13 et 15/04/2004. Faculté des Sciences, Département de Chimie, Tlemcen, Algérie.

MEDJAHED W, KAJIMA J, MERZOUK H, BABA AHMED FZ.

Synthèse et évaluation de l'activité biologique des N-acyl-hydroxyméthylaziridines.

Première Journées scientifiques de l'UGEL, le 17 et 18/05/2005. Faculté des Sciences, département de Biologie, Université de Tlemcen.

BABA AHMED FZ, BOUANANE S, MEDJAHED W, MERZOUK H, KAJIMA M

Etude de l'activité des Aziridines sur la prolifération des lymphocytes.

IV èmes Journées Scientifiques de l'ANDRS le 06 et 08/09/2005. Faculté des Sciences, Université de Tlemcen.

BABA AHAMED FZ, BOUANANE S, MEDJAHED W, MERZOUK H, KAJIMA J.

Effets in vitro des N-Acyl-2-Hydroxymethyl Aziridines sur la prolifération des lymphocytes stimulés par les agents mitogènes.

2^{ème} Journées scientifiques de l'UGEL, le 18 et 19/04/2006. Faculté des Sciences, département de Biologie, Université de Tlemcen.

BABA AHMED FZ, BOUANANE S, MEDJAHED W, MERZOUK H, KAJIMA M.

Contribution à l'étude in vitro des effets des aziridines sur la prolifération lymphocytaire chez les femmes atteintes d'un cancer du sein.

BOUANANE S, BABA AHMED FZ, MEDJAHED W, MERZOUK H, KAJIMA M.

Détermination in vitro de l'effet d'une substance chimique à noyau aziridine sur la prolifération lymphocytaire

Colloque International BioTech World 2007, le 24 et 25 /11/2007, département de Biotechnologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran.

BABA AHMED FZ, BOUANANE S, MERZOUK SA, MERZOUK H, MEDJAHED W, KAJIMA MULENGI J.

Effets des aziridines de synthèse sur la lymphoprolifération chez les personnes obèses.

LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXES

Tableau A1: Prolifération des lymphocytes stimulés par la Con A ou par la LPS (nombre de cellules x 10^5 /puit) en présence et en absence de l'aziridine 1 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A2 : Indice de prolifération des lymphocytes stimulés par la Con A ou par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 1 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A3 : Prolifération des lymphocytes stimulés par la Con A ou par la LPS (nombre de cellules x 10^5 /puit) en présence et en absence de l'aziridine 2 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A4 : Indice de prolifération des lymphocytes stimulés par la Con A ou par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 2 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A5 : Prolifération des lymphocytes stimulés par la Con A ou par la LPS (nombre de cellules x 10^5 /puit) en présence et en absence de l'aziridine 3 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A6 : Indice de prolifération des lymphocytes stimulés par la Con A ou par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 3 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A7 : Prolifération des lymphocytes stimulés par la Con A ou par la LPS (nombre de cellules x 10^5 /puit) en présence et en absence de l'aziridine 4 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A8 : Indice de prolifération des lymphocytes stimulés par la Con A ou par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 4 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A9 : Teneurs en protéines totales des lymphocytes stimulés par la Con A et par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 1 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A10 : Teneurs en protéines totales des lymphocytes stimulés par la Con A et par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 2 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A11: Teneurs en protéines totales des lymphocytes stimulés par la Con A et par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 3 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A12 : Teneurs en protéines totales des lymphocytes stimulés par la Con A et par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 4 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A13 : Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes T et d'interleukines 6 (IL-6) par les lymphocytes B activés et incubés en présence de l'aziridine 1, chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A14 : Production d'interleukines2 (IL-2) par les lymphocytes T et d'interleukines 6 (IL-6) par les lymphocytes B activés et incubés en présence de l'aziridine 2, chez les témoins et chez les femmes cancéreuses

Tableau A15 : Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes T et d'interleukines 6 (IL-6) par les lymphocytes B activés et incubés en présence de l'aziridine 3, chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A16: Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes T et d'interleukines 6 (IL-6) par les lymphocytes B activés et incubés en présence de l'aziridine 4, chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

Tableau A17 : Composition en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T en présence de l'aziridine 3, à 1mM (en % pondéraux des AG totaux)

Tableau A18 : Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 1) durant les 14 jours d'observation.

Tableau A19: Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 2) durant les 14 jours d'observation.

Tableau A20: Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 3) durant les 14 jours d'observation.

Tableau A21: Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 4) durant les 14 jours d'observation

Tableau A22: Evolution de la croissance relative (%) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

Tableau A23: Consommation alimentaire (g/j/rat) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

Tableau A24: Ingestion d'eau (ml/j/rat) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

Tableau A25: Quantité de fèces excrétés (g/j/rat) par les rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

Tableau A26: Volume d'urine (ml/j/rat) éliminé par les rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

Tableau A27: Valeurs moyennes des globules blancs, globules rouges et d'hémoglobine chez les rats témoins et expérimentaux.

Tableau A28: Valeurs moyennes des lipides sériques (cholestérol total CT, triglycérides TG et phospholipides PL) chez les rats témoins et expérimentaux.

Tableau A29: Valeurs moyennes des teneurs sériques en protéines totales et en glucose chez les rats témoins et expérimentaux.

Tableau A30: Valeurs moyennes des teneurs sériques en créatinine, en urée et en acide urique chez les rats témoins et expérimentaux.

Tableau A31: Valeurs moyennes des teneurs urinaires en créatinine, en urée et en acide urique chez les rats témoins et expérimentaux.

Tableau A32: Valeurs moyennes des concentrations de transaminases (TGO et TGP) exprimées en (UI) chez les rats témoins et expérimentaux.

Tableau A33: Nourriture ingérée exprimée en (g/j/rat) chez les rats témoins et expérimentaux.

Tableau A34: Apport énergétique exprimé en ($\text{KJ/j/P}^{0.75}$) chez les rats témoins et expérimentaux.

Tableau A35: Rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Tableau A36: Azote ingéré, urinaire, fécal et excrété (mg/j/ rat) chez les rats témoins et expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Tableau A37: Coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote (CUD_N), Bilan azoté (BA) chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Tableau A38: Lipides ingérés, lipides fécaux, et coefficient d'utilisation digestive apparente des lipides (CUD_L) chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

LISTE DES PLANCHES

- Planche 1 :** Coupes histologiques de foie de rats témoins (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (B)..... P121
- Planche 2 :** Coupes histologiques de poumon de rats témoins (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (B).....P122
- Planche 3 :** Coupes histologiques de rate de rats témoins (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (B).....P123
- Planche 4 :** Coupes histologiques du muscle gastrocnémien de rats témoins (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (B).....P124
- Planche 5 :** Coupes histologiques de cœur de rats témoins (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (B)..... P125
- Planche 6 :** Coupes histologiques de pancréas de rats témoins (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (B).....P126
- Planche 7 :** Coupes histologiques du tissu adipeux de rats témoins (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (B).....P127
- Planche 8 :** Coupes histologiques de rein de rats témoins (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (B).....P128
- Planche 9 :** Coupes histologiques de cerveau de rats témoins (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (B).....P129

SOMMAIRE

AVANT PROPOS.....	1
INTRODUCTION	2
MATERIELS ET METHODES.....	22
I. Etude invitro.....	22
I.1. Population étudiée	22
I.2. Prélèvements sanguins	22
I.3. Frottis sanguin	22
I.4. Isolement des lymphocytes	23
I.5. Préparation des substances chimiques contenant le noyau aziridine.....	26
I.6. Test de transformation lymphoblastique (TTL).....	26
I.6.1. Comptage des lymphocytes	28
I.6.2. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT.....	28
I.6.3. Dosage des protéines	30
I.7. Dosage des Interleukines	31
I.7.1. Dosage des Interleukines 2 (IL-2).....	31
I.7.2. Dosage des Interleukines 6 (IL-6)	32
I.8. Détermination de la composition en acides gras des phospholipides membranaires	32
I.9. Analyse de l'ADN.....	33
I.9.1 Extraction de l'ADN	34
I.9.2 Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose.....	34
II. Etude in vivo : Essais de toxicité aigue.....	35
II.1. Animaux.....	35
II.2 Détermination de la dose létale 50 (DL50) et Observation des manifestations de l'intoxication aigue.....	36
II.3. Analyse des paramètres hématologiques.....	41
II.3.1. Numération des globules rouges et des globules blancs	41
II.3.2. Dosage de l'hémoglobine	41
II.4. Analyse des paramètres biochimiques	41
II.4.1 Détermination des teneurs en créatinine	41
II.4.2 Détermination des teneurs en urée	41
II.4.3 Détermination des teneurs en acide urique.....	42
II.4.4. Détermination des teneurs en protéines totales	42
II.4.5. Détermination des teneurs en glucose	42
II.4.6 Détermination des teneurs en cholestérol, triglycérides et phospholipides	42
II.4.7. Détermination des lipides totaux des organes (le foie, la rate, le muscle gastrocnémien, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux).....	43
II.4.8. Détermination de l'activité enzymatique des transaminases (TGO, TGP).....	43
II.5. Bilans nutritionnels.....	44
II.5.1. Détermination du contenu en azote	45
II.5.2. Détermination des teneurs en lipides	45
II.6. Etude histologique	45

III. Analyse statistique.....	46
RESULTATS ET NTERPRETATIONS.....	47
I. Effets in vitro des aziridines de synthèse sur la prolifération des lymphocytes humains stimulés par les agents mitogènes.....	47
I.1. Structure et nombre des leucocytes.....	47
I.2. Effets des aziridines sur la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B.....	47
I.3. Effets des aziridines sur la production d'interleukines 2 et 6 (IL-2, IL-6).....	52
I.4. Composition en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes (pourcentage pondéraux).....	69
I.5. Caractère alkylant des aziridines	70
II. Effets in vivo des aziridines de synthèse chez le rat wistar : Essais de toxicité aigue.....	74
II.1. Détermination de la dose létale 50 : DL50	74
II.2. Manifestation de la toxicité aigue.....	79
II.3. Variation du poids corporel et de la croissance relative des rats.....	79
II.4. Variation des ingestions et des excréctions.....	88
II.4.1. Variation de l'ingestion d'aliments et d'eau.....	88
II.4.2. Variation de l'excrétion de fèces et d'urine.....	88
II.5. Variation des paramètres hématologiques	91
II.6. Variation des paramètres Biochimiques.....	95
II.6.1. Effets des aziridines sur les teneurs sériques en lipides.....	95
II.6.1.1. Teneurs sériques en cholestérol total	95
II.6.1.2. Teneurs sériques en triglycérides	96
II.6.1.3. Teneurs sériques en phospholipides (PL)	96
II.6.2. Effets des aziridines sur les teneurs sériques en protéines	96
II.6.3. Effets des aziridines sur les teneurs sériques en glucose	97
II.6.4. Effets des aziridines sur les teneurs sériques en créatinine, en urée et en acide urique.....	97
II.6.5. Effets des aziridines sur les teneurs urinaires en créatinine, en urée et en acide urique.....	97
III. Effets des aziridines sur le poids et la composition des organes.....	101
III.1. Poids des différents organes.....	101
III.2. Teneurs en lipides totaux des organes	101
III.3. Teneurs en protéines totales des organes	102
III.4. Activités des transaminases hépatiques.....	102
IV. Bilans nutritionnels.....	110
IV.1. Gain pondéral quotidien	110
IV.2. consommation alimentaire, apport énergétique et rapport d'efficacité nutritionnelle (REN)	110
IV.3. Azote ingéré et excrété	112
IV.4. coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote (CUD _N) et bilan azoté (BA)	112

IV.5. Lipides ingérés et excrétés et coefficient d'utilisation digestive apparente des lipides (CUD _L)	112
V. Effets des aziridines sur l'architecture tissulaire au niveau des organes	118
DISCUSSION.....	130
CONCLUSION.....	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	167
ANNEXES.....	195

AVANT PROPOS

Notre travail s'inscrit dans le cadre de projets nationaux et internationaux (ANDRS, CNEPRU, TASSILI) portant d'une part sur la synthèse de nouvelles molécules à activité biologique, par l'équipe de chimistes du laboratoire Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), et d'autre part sur la détermination in vivo et in vitro de l'activité biologique et métabolique par l'équipe de biologistes du laboratoire Valorisation des actions de l'homme pour la protection de l'environnement et application en santé publique (VAHPEASAP) au niveau de l'université de Tlemcen, Faculté des Sciences.

L'aboutissement de ce travail allant de la synthèse organique à l'activité biologique témoigne de l'interdisciplinarité de la recherche scientifique et constitue une étape importante dans les expérimentations précliniques ayant pour but de s'assurer de la non toxicité de toute substance chimique nouvellement synthétisée, et de la réalité d'un effet pharmacologique pouvant conduire à une application thérapeutique.

Les objectifs essentiels de cette thèse de doctorat se résument en :

1. Le premier objectif est d'explorer les activités biologiques des aziridines, nouvellement synthétisées au niveau du laboratoire COSNA.
2. Le deuxième objectif est d'approfondir nos connaissances sur les effets in vitro des aziridines de synthèse sur la prolifération des lymphocytes humains stimulés par les agents mitogènes.
3. Le troisième objectif est de déterminer les effets in vivo des aziridines chez le rat Wistar, animal de laboratoire choisi pour les essais toxicologiques.

Le cancer constitue l'un des problèmes de santé à l'échelle mondiale et l'une des préoccupations majeures en matière de santé et de recherche dans toutes les régions du pays. L'ampleur de cette morbidité n'a fait que croître au cours de ces dernières années. Cette maladie est devenue l'une des causes essentielles des décès à un âge avancé dans les pays occidentaux (Bray et al., 2002). Selon les estimations de l'organisation mondiale de la santé, plus de 20 millions de personnes de par le monde sont atteints de cancers et la majorité d'entre elles vivent dans les pays en voie de développement (OMS, 2006). En France, en 20 ans (chiffres issus du rapport de la commission d'orientation sur le cancer publié en janvier 2003), l'incidence du cancer est passée de 170 000 en 1980 à 278 000, 20 ans après, soit une augmentation de 63 % du nombre des cancers (OMS, 2006). Au Canada, d'après les taux d'incidence actuels, on estime que 43 % des hommes et 38 % des femmes pourraient, à un moment ou l'autre de leur vie, être atteint de cancer (SCC, 2006). L'Algérie n'a pas échappé à cette tendance. Environ 30.000 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués chaque année dans notre pays, avec une augmentation de 50% du nombre de cas entre 1986 et 2000 (Revue de Presse, 2006). Près de 20.000 personnes meurent de cancer chaque année, ce qui représente une des principales causes de mortalité pour l'homme et pour la femme. Le nombre total de décès étant annuellement de l'ordre de 170.000 dans notre pays. Une telle situation peut s'expliquer selon les spécialistes en la matière, par la transition démographique, marquée notamment par l'environnement et les changements de mode de vie, avec en particulier la progression du tabagisme dans la population. Cette mortalité qui est très élevée est due à un diagnostic souvent tardif et à une prise en charge difficile et coûteuse. Tous ces chiffres expliquent pourquoi la lutte contre le cancer fait l'objet d'un soutien privilégié, par les services concernés dans le

monde, dans tous ses aspects : prévention, dépistage, amélioration de la qualité des soins, formation en cancérologie et recherche. La tendance actuelle est de soutenir des recherches qui assurent un continuum du laboratoire à la prise en charge des patients atteints de cancer.

Les progrès thérapeutiques réalisés ces dernières années dans les pays industrialisés sont difficilement transposables dans notre pays en raison de problèmes organisationnels et également de coûts. La prévention et le dépistage sont actuellement les armes les plus efficaces contre les cancers les plus répandus. Le cancer du poumon, du sein, du col, de l'utérus, du colon, du rectum et du naso-pharynx représentent plus de la moitié des nouveaux cas et sont hélas en progression rapide en Algérie. Dans les pays occidentaux, les cancers les plus souvent diagnostiqués sont le cancer de la prostate chez l'homme et le cancer du sein chez la femme, tandis que le cancer du poumon demeure le plus mortel (OMS, 2006).

Malgré la diversité de l'origine de cette pathologie et la complexité des mécanismes qu'elle met en jeu, les cellules cancéreuses se caractérisent toutes par les propriétés suivantes : l'indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, l'abolition de l'apoptose, la capacité proliférative illimitée, la capacité de susciter l'angiogenèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif. Ainsi pour remédier à cette pathologie les cliniciens, en plus des interventions chirurgicales et de la radiothérapie utilisent la chimiothérapie qui est basée sur l'utilisation de molécules cytotoxiques qui par leurs propriétés d'inhibition de la réplication de l'ADN ou de la mitose (Brun et al., 1998), visent préférentiellement les cellules se divisant activement dont les cellules tumorales.

Les traitements du cancer se sont développés depuis un demi-siècle et ont vécu plusieurs révolutions (Fabien et al., 2003). La première empirique, qui débute en 1950, voit l'obtention des premières rémissions complètes dans des leucémies aiguës de l'enfant par l'utilisation des glucocorticoïdes associés à des antimétabolites comme le Méthotrexate ou la Mercaptopurine.

Très rapidement se mettent en place les tests biologiques qui vont permettre de tester l'efficacité de nouveaux médicaments, essentiellement des lignées cellulaires transplantables dérivées de tumeurs expérimentales spontanées ou chimioinduites chez la souris. Ces tumeurs sont injectées en intra-péritonéal ou par voie intraveineuse chez des souris, elles ont une cinétique de croissance extrêmement rapide, tuant les animaux en quelques jours ou semaines. L'efficacité des nouvelles drogues est testée essentiellement sur la survie des animaux (« increased life span », ILS). Ces tests, encore très largement utilisés, ont permis la sélection de nombreux médicaments cytotoxiques largement utilisés jusqu'à ce jour et très efficaces chez l'Homme. Parmi ces médicaments anticancéreux, les plus utilisés se résument en des alcaloïdes et agents antimicrotubuline, des agents antimétabolites comme les antifolates et les antipirimidines, des agents alkylants comme les moutardes azotées, les aziridines et les hydrazines, des agents interagissant avec les topoisomérases comme les analogues de la camptothécine et les anthracyclines. Cependant, ces traitements n'ont pas de spécificité vis-à-vis des cellules humaines.

Au début des années 70, un réel effort international a été engagé visant à identifier les bases biologiques du cancer et ainsi, des cibles moléculaires plus spécifiques aux cellules humaines.

Ainsi, le développement de nouveaux médicaments ciblant des phénomènes biologiques identifiés et spécifiques des cancers est en pleine expansion. Globalement, les cibles moléculaires jusqu'en 1990 étaient essentiellement les nucléotides, l'ADN, l'ARN, la réplication et la transcription. Il existe plusieurs types d'agents chimiothérapeutiques. Ces médicaments perturbent les processus de la division cellulaire de différentes manières. Ils sont classés selon leur mécanisme d'action. On distingue des produits qui perturbent le fuseau mitotique (antifusoriaux), d'autres qui s'intercalent à l'ADN et induisent des cassures de cette dernière (intercalant, inhibiteurs de topoisomérase II) ou encore des molécules qui inhibent des enzymes de synthèse de l'ADN appelées antimétabolites (Fabien et al., 2003).

Le développement des quinze dernières années se fait vers le ciblage des protéines nucléaires, cytoplasmiques ou membranaires impliquées dans les cascades de la transduction des signaux, des récepteurs membranaires aux protéines de régulation du cycle cellulaire. En effet, une attention particulière a été portée ces dernières années au ciblage moléculaire des protéines régulatrices du cycle cellulaire et qui sont dérégulés dans les proliférations tumorales (Knockaert et al., 2002 ; Ruetz et al., 2003). Le développement de molécules destinées à induire l'apoptose des cellules cancéreuses est aussi très important et très prometteur (Zamzami et al., 2003). Un autre aspect de la thérapeutique qui porte les plus grands espoirs est le développement de molécules destinées à l'inhibition de la formation des métastases, la métastase étant un des paramètres les plus péjoratifs de la maladie cancéreuse (Singh et al., 2003) et à l'inhibition des télomérases, enzymes assurant l'intégrité des télomères qui représentent

des fragments d'ADN jouant un rôle important dans la survie cellulaire (Alberti et al., 2003).

Ainsi, les traitements anticancéreux sont nombreux, mais présentent des effets secondaires et s'attaquent surtout aux cellules tumorales matures mais non aux cellules souches cancéreuses, souvent à l'origine des récives. D'autant que la radiothérapie et la chimiothérapie n'arrivent pas à éliminer ces cellules dormantes qui prolifèrent très peu. Les traitements classiques s'attaquent spécifiquement aux cellules qui se divisent rapidement, parmi lesquelles figurent non seulement les cellules tumorales matures mais aussi les cellules des cheveux, les cellules sanguines et celles qui tapissent le tube digestif, ce qui explique le fait que les patients soumis à ces thérapies perdent leurs cheveux, souffrent de nausées et voient leur système immunitaire s'affaiblir considérablement (Brun et al., 1998).

Une nouvelle branche se développe aujourd'hui, l'immunothérapie appelée thérapie biologique qui consiste à se servir du système immunitaire du corps pour lutter contre les cellules cancéreuses. C'est tout ce qui tourne autour de l'immunité anti-tumorale.

L'immunité désignait initialement la résistance d'un organisme vis-à-vis d'un agent infectieux. Cette définition s'est ensuite élargie à l'ensemble des réactions tendant à éliminer des substances étrangères. L'immunité peut être définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme de reconnaître et de tolérer ce qui lui appartient en propre (le soi) et de reconnaître et de rejeter ce qui lui est étranger (le non soi) : les substances étrangères ou les agents infectieux auxquels il est exposé, mais aussi ses propres constituants altérés (comme des cellules tumorales). Elle met en jeu deux processus, l'immunité non spécifique, d'action immédiate, qui fait intervenir des cellules

responsables de la phagocytose, et l'immunité spécifique, qui se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique de la substance étrangère, prélude à sa destruction ; elle garde le souvenir de la rencontre.

Les lymphocytes occupent une place centrale dans la mesure où ils déterminent la spécificité de la réponse immunitaire (Koskinen et al., 2007 ; Chan et al., 2008). Les cellules qui interagissent avec les lymphocytes ont un rôle important dans la présentation des antigènes et dans la médiation des fonctions immunologiques. Ces cellules incluent les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les neutrophiles, mastocytes, basophiles et éosinophiles. Ces cellules jouent un rôle direct dans l'induction puis dans les phases effectrices de la réponse. Les lymphocytes B (immunité humorale) et T (immunité cellulaire) sont les cellules effectrices de l'immunité spécifique. L'immunocompétence d'un lymphocyte dépend de la synthèse d'un récepteur membranaire (BCR, B Cell Receptor pour les lymphocytes B ; TCR, T Cell Receptor pour les lymphocytes T) capable de reconnaître spécifiquement un antigène. De plus, les lymphocytes T possèdent des protéines membranaires reconnues par les anticorps (désignées par le préfixe CD, classes de différenciation). On distingue deux populations principales de lymphocytes T d'après la présence de ces protéines membranaires spécifiques, les lymphocytes CD8 et les lymphocytes CD4. Les lymphocytes CD8 sont des lymphocytes cytotoxiques (Tc) et les lymphocytes CD4 sont des lymphocytes helpers (Th). Les Th ont pour rôle d'activer des cellules de la réaction immunitaire : les macrophages, les lymphocytes B mais aussi les lymphocytes Tc. Selon l'environnement dans lequel ils se trouvent, les lymphocytes Th se différencient soit en lymphocytes Th1 soit en lymphocytes Th2. Les lymphocytes Th1 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire (lymphocytes

Tc). Les lymphocytes Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale (production d'anticorps). Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8) sont les éléments majeurs de la réponse immunitaire anti-tumorale (Domchek et al., 2007 ; Khanna et al., 2007 ; Ebel et al., 2008). Ces lymphocytes cytotoxiques CD8 reconnaissent les cellules tumorales par leurs antigènes de surface (Rey et al., 2005). Ces cellules agissent soit en produisant localement la perforine ou d'autres enzymes protéolytiques qui entraînent des lésions irréversibles sur la membrane cellulaire des cellules cibles, soit en produisant des cytokines entraînant par la suite une destruction des cellules cibles (Sutton et al., 2007). Cependant, les lymphocytes T auxiliaires (CD4), jouent également un rôle important dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette cellule à l'état de repos (Th0) peut être activée en Th1 et favorise la cytotoxicité en stimulant les lymphocytes CD8. Certains lymphocytes ne portent aucun des marqueurs B ou T, ce sont les cellules NK (Natural Killer) (Brittenden et al., 1996). Les cellules NK ont été qualifiées de cellules tueuses naturelles parce qu'elles exercent un effet cytotoxique direct sur les cellules anormales : cellules infectées par des virus ou cellules cancéreuses. Un récepteur membranaire détecte l'absence de molécules CMH de classe I à la surface des cellules cibles.

La découverte d'antigènes tumoraux (molécules exprimées sélectivement par les cellules cancéreuses) ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de l'immunothérapie du cancer (Chouaib et al., 2006 ; Ullrich et al., 2008 ; Loisel-Meyer et al., (2008). Les stratégies élaborées dans ce cadre visent à stimuler une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre les antigènes tumoraux, conduisant à la destruction des cellules cancéreuses par des lymphocytes tueurs (lymphocytes T CD8 cytotoxiques). Le mode

d'administration des antigènes tumoraux est un des éléments essentiels qui conditionne le succès de ces nouvelles formes de vaccination anticancéreuse. Une des méthodes les plus utilisées pour présenter ces antigènes aux lymphocytes consiste à utiliser des cellules dendritiques, qui sont de vraies cellules présentatrices professionnelles. Elles sont en effet capables de digérer les débris de cellules cancéreuses et de faire migrer à leur surface les antigènes grâce à différents mécanismes endocytiques et les présentent, après digestion, sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité CMH II ou I aux lymphocytes T CD4+ ou CD8+, capable de reconnaître et éliminer les cellules tumorales qu'ils trouveront sur leur chemin (Hu et al., 2000; Tanaka et al., 2005 ; Corthay, 2007).

Les relations entre système immunitaire et cancer ont fait l'objet de nombreuses recherches et il est bien admis que le cancer est une maladie dite immunosuppressive (Boitard et al., 1999 ; Gao et al., 2007).

Au cours du développement d'un cancer, le système immunitaire doit faire face à la prolifération de cellules malignes présentant à leur surface une signature particulière : les marqueurs tumoraux. Ces molécules, absentes des cellules saines, sont utilisées comme repère par certains acteurs du système immunitaire (les lymphocytes T) pour reconnaître la tumeur et la détruire (Bercovici et al., 2000). Les lymphocytes T sapent le cancer en l'assillant sur deux fronts : Cytotoxiques, ils détruisent d'une part les cellules cancéreuses ; D'autre part, ils relâchent une protéine, l'interféron, qui bloque l'angiogenèse tumorale, soit la formation du réseau de vaisseaux sanguins destiné à nourrir la tumeur et à favoriser sa croissance. Ce processus, qui est naturel, se développe

lentement. Pendant ce temps, le cancer progresse et le système immunitaire se voit vite dépassé par le nombre grandissant de cellules à éliminer (Nowell, 1986).

En effet, les patients victimes d'un cancer présentent un taux d'infections accru, et des anomalies immunitaires ont pu être détectées chez eux au cours d'études en laboratoire : le cancer, s'il est suffisamment étendu, perturbe le fonctionnement du système immunitaire (Reiche et al., 2005). Des anomalies associées à une déficience du système immunitaire sont particulièrement marquées au cours du cancer du sein (Forget, 2004). Inversement, l'incidence des cancers est plus élevée chez les patients porteurs d'un déficit immunitaire congénital ou d'un déficit acquis, à la suite, par exemple, d'un traitement immunosuppresseur : le système immunitaire ne détruit plus les cellules cancéreuses. Un stress chronique est associé à un affaiblissement des défenses immunitaires et expose à un risque élevé de cancer (Reiche et al., 2005). De plus, plusieurs expériences menées chez des souris montrent que lorsque le système immunitaire est déficient et qu'un cancer se développe, si on stimule le système immunitaire, ce cancer régresse (Joncker et al., 2005). Chez les souris présentant une tumeur spontanée du pancréas, le nombre de lymphocytes T activés effecteurs est très faible (Clark et al., 2007). Chez l'homme, les lymphocytes T activés sont aussi réduits au cours du cancer (Bussing et al., 2007).

Un autre fait important est que chez les patients cancéreux, le système immunitaire ne reconnaît pas les tumeurs comme dangereuses. En effet, le rejet tumoral efficace se fait grâce à la reconnaissance à la surface de la cellule tumorale d'un ou de plusieurs antigènes spécifiques présentés aux lymphocytes « T » cytotoxiques par les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité « CMH ». Cette reconnaissance est aidée par des molécules d'adhésion et de co-stimulation et permet une cascade

immunologique mettant en œuvre la libération de cytokines amplifiant la réponse cytotoxique (Pittet et al., 2001). Cette cascade cytotoxique devrait théoriquement conduire à la destruction tumorale. Cependant, l'absence ou la déficience d'un ou de plusieurs de ces acteurs peut conduire à un état d'anergie lymphocytaire et de tolérance vis-à-vis de la tumeur. De plus, les cellules tumorales dérivent des propres cellules de l'hôte. De ce fait, la majorité des molécules de surface des cellules cancéreuses existent dans les cellules « normales » de l'hôte et ne sont donc pas reconnues comme « étrangères » par le système immunitaire (Dunn et al., 2002).

Cependant, dans quelques cas, les cellules cancéreuses expriment des molécules « spécifiques » ou « antigènes tumoraux ». Il peut s'agir de protéines spécifiques (mutées) produites par les cellules cancéreuses, des oncogènes ou des anti-oncogènes mutés, spécifiques de la tumeur ou une surexpression d'antigènes « normaux ». Idéalement, ils pourraient, alors, être reconnus. Malheureusement, très souvent ces antigènes ne sont pas exprimés à la surface des cellules et sont donc inaccessibles aux anticorps.

Parmi les principales substances chimiques actives dans le système immunitaire, il y a les cytokines dont font partie les interférons et les interleukines. En effet, les cytokines peuvent être décrites comme les hormones du système immunitaire puisqu'elles interviennent dans le dialogue entre lymphocytes, macrophages et autres cellules intervenant au cours de la réaction inflammatoire et des réponses immunitaires (Van Kampen, 1997). Chez les patients dont le système immunitaire est déjà faible et chez qui le cancer en est encore à un stade peu avancé, on peut injecter des cytokines pour relancer la fonction immunitaire de l'organisme. Les interférons et les interleukines, dont le rôle dans la stimulation des lymphocytes T est connu depuis longtemps, ont fait l'objet de

nombreux essais cliniques, particulièrement dans le cas des mélanomes (Bickers et al., 2000). Le mélanome est une tumeur maligne de la peau issue des mélanocytes, cellules à l'origine de la pigmentation de la peau. Les médecins possèdent désormais suffisamment de données et de recul pour évaluer leur efficacité. Les protocoles ont en outre considérablement évolué depuis les premiers essais afin de rendre ces traitements moins toxiques. Lors de l'administration d'interleukine 2 ou d'interféron à des patients présentant des mélanomes métastatiques, des réponses positives sont observées dans 15 à 20 % des cas (Figlin et al., 1997 ; Negrier et al., 1998 ; Bien et al., 2007 ; Longo et al., 2007). Actuellement, les essais cliniques avec l'interféron ont quasiment été abandonnés au profit de l'interleukine 2 (IL-2). Cette dernière donne une réponse plus efficace (Bouet-Toussaint et al., 2000 ; Antony et al., 2006). L'IL-2 induit une stimulation et une prolifération des lymphocytes T activés ainsi que des cellules tueuses ou cellules NK. L'IL-2 est sécrétée essentiellement par les lymphocytes T de type CD4+ stimulés par les antigènes présentés par les macrophages et par l'IL-1. L'interaction entre un macrophage porteur d'un antigène présenté par les molécules CMH de classe II et le récepteur d'un lymphocyte T Helper, provoque au niveau du lymphocyte T la stimulation de la phospholipase C qui hydrolyse le phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'inositol triphosphate (IP3) libère le calcium intracellulaire (à partir du réticulum sarcoplasmique) et induit l'activation d'enzymes Ca⁺⁺-dépendantes dont l'activité est modulée par la calmoduline. La calmoduline chargée de calcium active la calcineurine (une phosphatase) qui favorise la translocation nucléaire du facteur transcriptionnel NF-AT (un facteur essentiel à la transcription du gène de l'interleukine-2) induisant la synthèse d'IL-2 dans les cellules

lymphoïdes (Ehring et al., 2000). De plus, l'IL-2 augmente l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8, stimule la prolifération, la différenciation des lymphocytes B et augmente la cytotoxicité des monocytes. Elle induit la sécrétion de multiples cytokines comme : l'interféron gamma, le « TNF », l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-4, l'IL-6, etc (Eguizabal et al., 2007; Pallikkuth et al., 2007).

Les effets de l'interleukine 2 avaient déjà été testés à l'Institut Curie entre 1990 et 1997 sur plus d'une centaine de patients atteints de cancer du rein (Tourani et al., 1997). Malgré des effets toxiques, une régression de la tumeur avait été constatée dans 15 à 20 % des cas et des réponses prolongées ont même été observées pour 5 % d'entre eux. La plupart du temps, la rechute métastatique s'est avérée plus lente et des absences de récurrence ont également été observées chez certains patients.

Ces premiers essais avaient permis d'optimiser le protocole d'administration de l'interleukine. Dans une première phase, les lymphocytes anti-tumoraux étaient stimulés *in vitro* en présence d'interleukine 2, puis injectés au patient en grande quantité. A partir de 1998, l'activation des lymphocytes T était réalisée par injection directe d'interleukine au patient. Ce mode d'administration a l'avantage d'être moins toxique, plus efficace et moins onéreux que le précédent.

L'immunothérapie a réellement fait son entrée dans la panoplie des approches thérapeutiques contre le cancer, notamment après les travaux sur les mécanismes d'activation de certaines cellules du système immunitaire (les cellules Th) dans la lutte contre les cellules cancéreuses (Stagg et al., 2007). Les cancérologues ont basé leurs recherches sur l'hypothèse que le développement de cellules cancéreuses est un phénomène naturel qui se produit régulièrement tout au long de la vie d'un être humain,

mais que le système immunitaire est, dans la plupart des cas, capable de détruire ces cellules. Le cancer serait donc le résultat d'une défaillance du système immunitaire. Cette théorie a suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années, mais il était difficile d'étudier les mécanismes de défense immunitaire contre les cellules cancéreuses. Comment peut-on en effet observer l'apparition de cellules invisibles, détruites immédiatement après leur formation ?

Alexandre Corthay et ses collaborateurs ont élaboré une méthode permettant l'observation de ces mécanismes. Ils ont recréé les conditions de défense immunitaire chez des souris génétiquement modifiées (Corthay et al., 2005). La nouvelle méthode consiste à injecter aux souris un gel contenant des cellules cancéreuses. Ce gel a la propriété d'être liquide à basses températures, et de se solidifier à 37°C. Après injection sous la peau des souris, le gel se solidifie immédiatement et permet aux chercheurs de localiser les cellules cancéreuses à tout moment et d'étudier la réaction du système immunitaire.

Alexandre Corthay et ses collaborateurs ont montré que les mécanismes de défense immunitaire se déclenchaient à un stade très précoce et que si le système immunitaire n'était pas venu à bout des cellules cancéreuses après deux semaines, le cancer s'installait. Ces chercheurs norvégiens ont utilisé des cellules immunitaires (cellules Th) et des cellules cancéreuses particulières, mais affirment que leurs résultats peuvent s'appliquer à d'autres types de cellules. Ces résultats ouvrent de nouvelles voies dans la lutte contre le cancer et pourraient amener à des traitements basés sur les mécanismes de défense immunitaire.

La connaissance des mécanismes d'activation et d'amplification de la réponse immunitaire ouvre un champ de la médecine dont l'immunomodulation est une application potentielle. En inhibant la prolifération des lymphocytes, nombre d'immunosuppresseurs bloquent l'induction d'une tolérance immunitaire. Celle-ci est précisément l'objectif d'approches ciblant les structures de reconnaissance de l'antigène, de co-stimulation ou les cytokines. Une caractérisation moléculaire des états fonctionnels qui conduisent à l'activation lymphocytaire est aujourd'hui accessible, et susceptible d'ouvrir la voie à la définition de nouvelles cibles thérapeutiques de l'immunomodulation. L'approche thérapeutique par l'immunothérapie permet de restaurer le système immunitaire et lui permettre de fonctionner de manière optimale. Dès lors que le système immunitaire est restauré, il va jouer son rôle qui est de détruire tous les corps étrangers dont les cellules cancéreuses qui sont des cellules anormales. D'où l'idée de multiplier les lymphocytes afin d'augmenter la rentabilité du processus.

Toutes ces données montrent que la manipulation du système immunitaire à des fins thérapeutiques contre le cancer est un concept possible. Pour certains oncologues, une meilleure efficacité thérapeutique est obtenue lorsque l'immunothérapie est utilisée en association avec des drogues anti-tumorales (Fabien et al., 2003).

Les aziridines sont des agents alkylants anti-tumoraux (Huang et al., 2004 ; Vainchtein et al., 2007), leurs activités thérapeutiques ont été décrites pendant plus d'une décennie. En raison de la présence d'un anneau hétérocycle, les aziridines ont montré une grande réactivité vis-à-vis des composés nucléophiles et électrophiles (Kiss et al., 2007). Les aziridines représentent des agents chimiothérapeutiques d'un grand intérêt dont les activités anticancéreuses et antibiotiques sont largement démontrées (Reynolds, 1995 ;

Papaiouannou et al., 2001; Den Brok et al., 2005). Ces molécules sont des agents alkylants, et présentent une affinité particulière pour l'ADN (Vedejs et al., 2003; Warner et al., 2007). L'interaction entre ces agents et l'acide nucléique empêche la réplication de l'ADN, perturbe la division cellulaire, inhibe la synthèse des protéines (Remers et al., 1995 ; Schirmeister, 1999) et sont donc largement utilisées dans le traitement de cancer.

Dans les molécules biologiques, les groupes les plus sensibles aux agents alkylants sont les groupements SH, OH, CO₂H des protéines ainsi que les groupes NH₂ et NH des bases puriques et pyrimidiques. En général, ces groupes réactifs comportent un proton mobile qui peut s'échanger contre un groupe alkyle. Dans la guanine, c'est l'azote N7 et à moindre degré, l'oxygène O6 qui sont les plus réactifs créant des liaisons covalentes avec les agents alkylants (Zabska et al., 1987; Li et al., 1997 ; Voloshchuk et al., 1999). Musser et al. (1992) ont élaboré un processus réactionnel par le quel le thiotépa et le tépa (dérivés d'aziridine) se lient à l'ADN à la position N 7 du noyau pentagonal de la guanine.

De nombreuses études ont démontré également l'alkylation de l'ADN avec les aziridines. Humayoun et al. (1975) ont synthétisé une mitomycine C analogue de la Bis-Aziridinopyrrolidinoquinone, un agent actif contre les tumeurs. Ces composés induisent d'une façon efficace des liaisons transversales covalentes dans l'ADN. Ils ont pu démontrer cette propriété par le test de fluorescence à l'éthidium sur les cellules tumorales. Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique et peut facilement détecter les liaisons transversales produites par la Bis-Aziridinopyrrolidinoquinone. La Bis-Aziridinopyrrolidinoquinone devient fluorescente avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'elle est

liée à l'ADN. Ceci est confirmé par le test indépendant utilisant la S1-endonucléase, une nucléase qui coupe la liaison phosphodiester entre les nucléotides du brin simple d'ADN. Les aziridinoquinones provoquent d'une façon efficace des liaisons transversales dans l'ADN. Les chercheurs ont observé une corrélation directe entre la quantité de liaisons transversales covalentes et le contenu (G + C) de l'ADN.

Le Pla et al. (2005) ont isolé deux azinomycines A et B portant un noyau aziridine différentes par le radical X (X=CH₂ pour l'azinomycine A et X=CHOH pour l'azinomycine B) à partir de cultures de bactéries *Streptomyces griseofuscus* S42227. Ces composés montrent des propriétés anti-tumorales in vivo intéressantes dues à la formation de ponts interbrins de l'ADN. Ils ont démontré que l'azinomycine B génère une di-alkylation de l'ADN entre deux bases puriques grâce à son cycle aziridine. Cette alkylation de l'ADN a été confirmée par une réduction marquée dans la mobilité électrophorétique de l'ADN. L'activité de l'azinomycine est importante sur les tumeurs de la vessie et certaines tumeurs digestives (œsophage, estomac, pancréas, côlon).

L'importance des aziridines s'étend de leur utilité dans le développement de nouveaux médicaments potentiels à visée anticancéreuse ou antivirale à leurs fonctions biologiques. Il a été démontré que les aziridines possèdent une activité immunotropique marquée (Kowalczyk-Bronisz et al., 1986 ; Hanessian et al., 2000). Les aziridines modulent les deux systèmes immunitaires aussi bien humoraux que cellulaires. Ainsi certaines recherches ont montré que les aziridines sont immunostimulantes (Bicker, 1978). C'est le cas de BM 12, 531 (2-cyan substituted aziridine) qui provoque une augmentation spontanée de la concentration des lymphocytes T chez les patients cancéreux et module le système immunitaire chez les animaux. Srikrishnan (1990) a montré qu'Azimexon [2-

cyanaziridinyl-2-carbamoyl-aziridinyl-1-propane], dérivé de 2-cyanaziridine employé dans le traitement des mélanomes, est un immunostimulant et montre des effets thérapeutiques dans des modèles de tumeur et des infections expérimentales chez les souris. In vitro, cette substance augmente la concentration des lymphocytes T chez les souris. Chez les patients cancéreux, elle augmente le rapport T4/T8 et est employé dans le traitement des mélanomes (Srikrishnan, 1990).

D'autres chercheurs ont montré que les aziridines peuvent être aussi des molécules immunodépressives induisant un déficit immunitaire comme le ciamexon (dérivé d'aziridine) (Baier et al., 1991).

Baier et al. (1991) ont développé des modèles cellulaires humains afin d'étudier l'action des aziridines sur les cellules T. Ils ont montré que le Ciamexone, dérivé de 2-cyanaziridine, régule les cellules T. Sur la base de ces observations, le Ciamexone semble être un agent immunosuppresseur fortement sélectif. Afin d'évaluer encore d'autres mécanismes possibles du Ciamexone, les mêmes chercheurs ont étudié son influence in vitro sur la production du gamma Interféron (IFN gamma) par les lymphocytes T stimulés par la phytohémagglutinine (PHA agent mitogène spécifique des cellules T) de 15 patients atteints de tumeur et de 12 sujets témoins en bonne santé. La production du IFN- Gamma a été mesurée par ELISA. Ils ont constaté une augmentation du nombre des lymphocytes T suite à la stimulation par l'agent mitogène, associée à une augmentation de la production d'IFN gamma chez les deux groupes étudiés. L'addition de Ciamexone aux lymphocytes T stimulés par la PHA provoque une réduction de la production d'IFN

gamma chez les patients et chez les témoins. Ces résultats corroborent toutes les investigations montrant la modulation du système immunitaire par les aziridines.

Guilbaud et al. (2001) ont synthétisé un composé dénommé S 23906-1 (acronycine, un dérivé d'aziridine). Cette substance chimique possède un profil pharmacologique original. Ce dérivé d'aziridine se caractérise *in vitro* par une puissante activité cytotoxique et par des perturbations du cycle cellulaire, différentes de celles de la plupart des agents anticancéreux. *In vivo*, il présente une sélectivité pour les tumeurs humaines. Ils ont évalué l'activité antitumorale de ce composé, administré par voie orale, dans des modèles orthotopiques de tumeurs humaines de côlon greffées sur le caecum de souris nude (souris immuno-déficientes). Trois tumeurs coliques ont été greffées au jour 0 : HT29, LS174T et HCT116. Dans les trois modèles, le traitement des animaux avec le S 23906-1, administré à des doses allant de 1,56 mg/kg à 6,25 mg/kg, se traduit par une inhibition significative de la croissance de la tumeur primaire après 12 et 22 jours d'expérimentation. Un effet comparable est obtenu après traitement des animaux par l'acronycine utilisé en clinique dans le traitement du cancer colique. L'étude histologique des différents organes prélevés à la fin de l'expérience dans le modèle HCT116 montre que l'administration de S 23906-1 supprime totalement la carcinose péritonéale ainsi que la formation de métastases hépatiques, pulmonaires et ganglionnaires (ganglions lymphatiques mésentériques).

Les travaux de Siwy et al. (2007) ont mis en évidence le pouvoir anticancéreux d'une nouvelle série de dérivés 1,3-(oxytetraéthylénoxy)-cyclotriphosphazène contenant le noyau aziridine. Leur activité cytostatique *in vitro* sur les cellules cancéreuses coliques

humaines de la lignée HI-60, d'A549 et de HCV29T a été bien étudiée. L'addition de 1,3-(oxytetraéthylénoxy)-cyclotriphosphazène dans le milieu de culture entraîne une inhibition dose-dépendante de la prolifération cellulaire. Cette inhibition est observée à la concentration de 0.2 µg/ml, celle-ci devient totale pour une concentration de 0.4 µg/ml. L'étude du cycle cellulaire montre que 1,3-(oxytetraéthylénoxy)-cyclotriphosphazène induit un blocage des cellules au niveau de la phase de transition G2/M, entre la seconde phase de croissance et la division cellulaire. L'étude du marquage immunofluorescent, à l'aide des anticorps anti-tubuline marqué à la fluorescéine, montre que ce blocage est dû à une dépolymérisation du réseau microtubulaire, en empêchant l'accumulation anormale de tubuline dans les tumeurs. Ces dérivés peuvent représenter une nouvelle classe d'agent anticancéreux.

Il apparaît donc clairement que la caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des effets anti-tumoraux des aziridines pourrait conduire à la mise en place d'un essai d'immunothérapie qui constitue une nouvelle voie d'approche pour la thérapie des cancers.

Afin d'explorer de nouvelles aziridines à activité biologique, nous avons choisi comme modèle le cancer du sein, en raison de sa fréquence élevée non seulement dans les pays occidentaux mais également en Algérie. Une étude épidémiologique sur le cancer du sein chez les femmes hospitalisées en gynécologie au CHU de Tlemcen indique qu'en 2007, 150 femmes sont atteintes du cancer du sein dont plus de 70% ont une tumeur maligne (Résultats non publiés). En Algérie le taux d'incidence est de 14 cas pour 100.000 habitants par an (OMS, 2006).

De plus, le cancer du sein est caractérisé par une déficience immunitaire notamment une réduction des lymphocytes T et des cellules NK.

Ainsi, l'immunothérapie constitue une nouvelle voie d'approche pour la thérapie du cancer du sein. Les grandes avancées en terme de compréhension des mécanismes de prolifération tumorale ont permis la mise en place de traitements très efficaces. Dans ce travail, nous nous sommes donc fixés plusieurs objectifs :

1-le premier objectif est de déterminer les effets in vitro des aziridines de synthèse sur la prolifération des lymphocytes humains stimulés par les agents mitogènes.

2- le deuxième objectif est de voir les effets in vitro des aziridines sur les lymphocytes de patients atteints de cancer du sein.

3- le troisième objectif est de déterminer les effets in vivo des aziridines chez le rat Wistar, animal de laboratoire choisi pour les essais toxicologiques.

Par conséquent, nous voulons apporter une contribution sur l'intérêt et l'importance de l'utilisation des aziridines au cours de l'immunothérapie. Notre projet de recherche devrait permettre de développer une immunothérapie anticancéreuse basée sur l'utilisation des substances aziridines nouvellement synthétisées au niveau du laboratoire COSNA (Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses) de l'Université de Tlemcen, et de mieux situer la place de cette nouvelle approche dans l'arsenal thérapeutique contre le cancer.

MATERIEL ET METHODES

I. Etude in vitro

I.1. Population étudiée

Les échantillons de sang proviennent de femmes atteintes d'un cancer du sein dans le service de maternité du centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen, et de femmes volontaires en bonne santé considérées comme témoins. Les femmes participant à cette étude sont informées sur les objectifs et le déroulement du travail et leur consentement est demandé préalablement.

I.2. Prélèvements sanguins

Ils se font à jeun, au niveau de la veine du pli du coude, sur des tubes avec un anticoagulant (héparine ou EDTA). 4 ml de sang sont prélevés et servent à l'isolement des lymphocytes le jour même du prélèvement.

I.3. Frottis sanguin

L'examen du frottis de sang permet d'étudier avec précision la morphologie cellulaire et de caractériser les différents types de cellules.

Une gouttelette de sang est déposée sur une lame en verre et sert à la préparation du frottis sanguin. La coloration permet l'identification des leucocytes grâce à leurs caractéristiques propres mises en évidence par un colorant approprié. On réalise la coloration du frottis par une solution de May-Grunwald-Giemsa, basée sur l'emploi successif de deux colorants : le May-Grunwald et le Giemsa. Le premier fixe le frottis par son alcool méthylique et colore les éléments acidophiles et les granulations spécifiques des leucocytes. Le second colore surtout les noyaux et les parties azurophiles.

Le frottis est examiné au microscope à l'aide de l'objectif à immersion (objectif 100), puis est photographié (Zeiss, Axioplan, Germany).

I.4. Isolement des lymphocytes

L'isolement des lymphocytes se fait à partir d'un prélèvement sanguin par centrifugation dans un gradient de Ficoll. Le Ficoll, dont la densité est de 1.075, permet l'agrégation des hématies. La migration différentielle durant la centrifugation résulte en la formation de différentes couches contenant les différents types de cellules sanguines. Ainsi, les globules rouges et les granulocytes sédimentent complètement et se retrouvent dans le culot. Les lymphocytes ayant une densité inférieure à celle du Ficoll (**Tableau 1**) se trouvent à l'interface entre le Ficoll et le plasma après centrifugation. Ils sont par contre contaminés par d'autres cellules à sédimentation lente (Monocytes, plaquettes) (**figure 1**). Les lymphocytes sont récupérés de l'interface puis sont lavés pour éliminer les contaminants (Ficoll, plasma, plaquettes,...). Le lavage se fait avec une solution saline équilibrée, dont la composition est donnée en annexe.

Après mélange et centrifugation, le surnageant est éliminé. Le lavage est recommencé deux fois, et les lymphocytes isolés sont prêts à l'emploi.

Les lymphocytes lavés sont par la suite remis en suspension dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640 (dont la composition est donnée en annexe).

Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 50µl de cette suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 % (colorant permettant de distinguer les cellules vivantes) et 50µl de milieu RPMI 1640. La numération cellulaire est effectuée sur une chambre quadrillée « Cellule de Malassez ». Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 4.10^6 cellules/ml.

Tableau 1: Taille et densité des cellules sanguines

	Taille (μM)	Densité	Vitesse de sédimentation
Globules rouges	7 (6.5-7.5)	1.098 (1.098-1.105)	+
Éosinophiles	12 (12-15)	1.091 (1.087-1.096)	↑
Neutrophiles	12 (12-15)	1.088 (1.082-1.097)	
Basophiles	9.5 (9-10)	1.078 (1.074-1.082)	
Monocytes	15 (15-20)	1.071 (1.065-1.075)	
Lymphocytes	9 (8-10)	1.063 (1.057-1.067)	
Plaquettes	2-3	1.040	

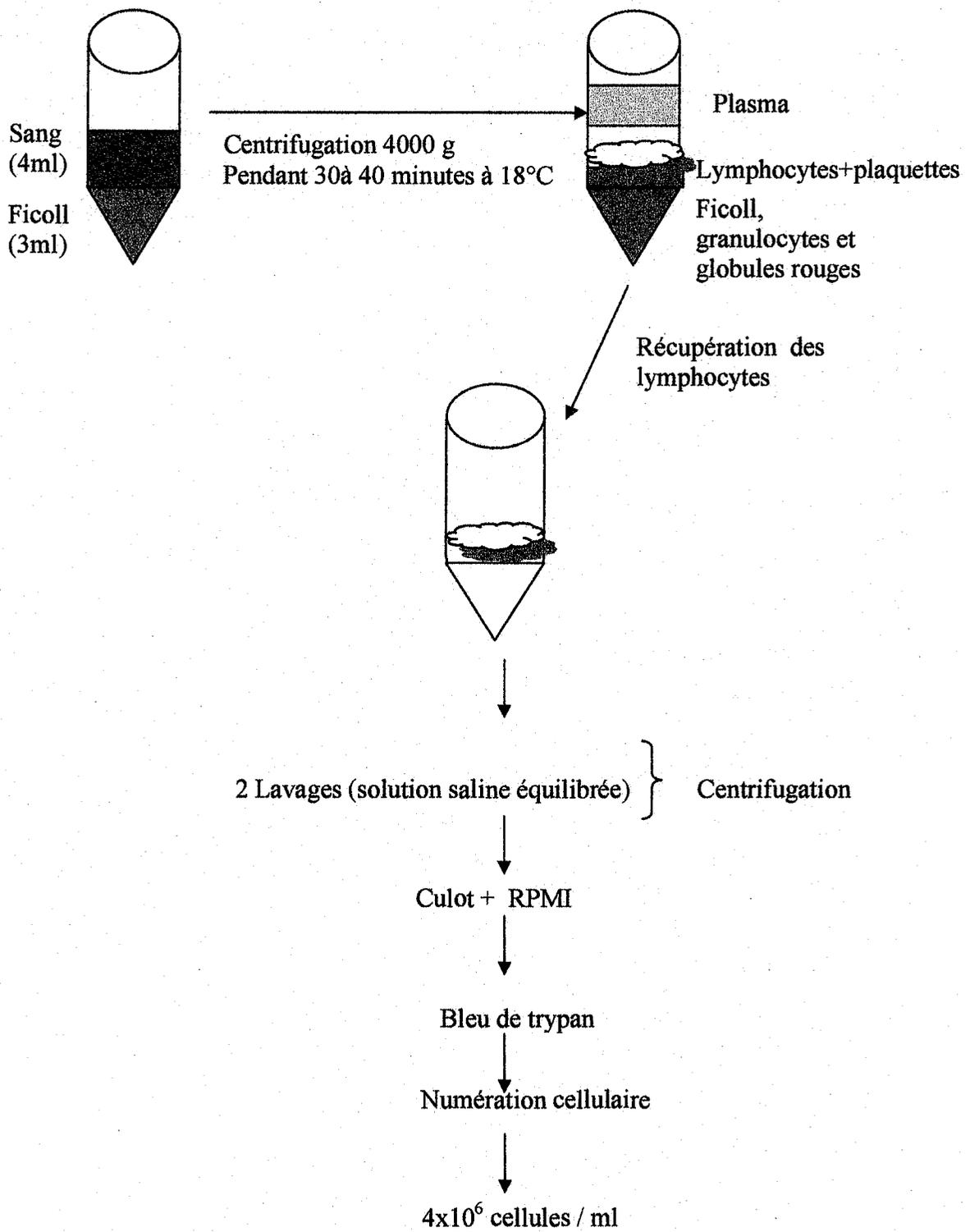


Figure 1: Méthode d'isolement et purification des lymphocytes

I.5. Préparation des substances chimiques contenant le noyau Aziridine

Quatre nouvelles aziridines synthétisées, différentes par le radical R (**figure 2**) ont été obtenues du laboratoire de chimie (COSNA) sous la direction du professeur Kajima Mulengi. Les réactions chimiques utilisées pour la synthèse de ces quatre aziridines à partir d'acides aminés (glycine pour l'aziridine 1, alanine pour l'aziridine 2, phénylalanine pour l'aziridine 3 et Tryptophane pour l'aziridine 4) ont été publiées et décrites précédemment (Medjahed et al., 2004). La structure chimique et le poids moléculaire de chaque substance sont donnés dans le **Tableau 2**.

Les aziridines sont solubilisées dans un solvant organique tel que le DMSO (diméthyl sulfoxyde) et l'éthanol pour obtenir une solution mère de 100mM. Par la suite, des solutions de concentrations différentes [0µM-10µM-100µM-500µM-5mM-10mM] sont préparées à partir de la solution mère avec un volume final de 1 ml dans le milieu RPMI 1640. Ces solutions sont gardées à l'abri de la lumière à 4°C pendant au moins 12 heures avant l'utilisation, pour assurer une meilleure efficacité de l'aziridine.

I.6. Test de transformation lymphoblastique (TTL)

Le TTL permet d'étudier la prolifération in vitro des lymphocytes T et B stimulés par des agents mitogènes spécifiques. La Concanavaline A (Con A Sigma, St. Louis, MO, USA), mitogène spécifique des cellules T est utilisée à une concentration finale de 5 µg/ml et la lipopolysaccharide (LPS, Sigma, St. Louis, MO, USA) mitogène spécifique des cellules B à une concentration finale de 20 µg/ml. Les cultures sont réalisées sur des plaques ELISA de 96 puits à fond plat (Nunc- Elisa).

Les lymphocytes sont mis en culture (4×10^5 cellules/puit) dans le milieu RPMI 1640 au quel sont ajoutés le tampon HEPES (25 mM), 10% sérum du veau foetal, L - Glutamine (2mM), 2-mercaptoethanol (5×10^{-5} M), pénicilline (100 UI/ml) et

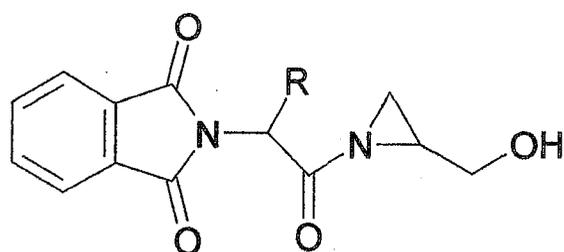
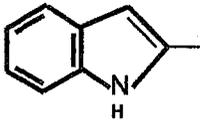


Figure 2 : Structure générale des aziridines de synthèse

Tableau 2 : Structure (radical R) et poids moléculaires des aziridines.

Aziridines	Radical R	Poids moléculaire g/mole	Dénomination chimique
Aziridine 1	H	260.3	<i>N</i> -phtalimidoglycyl-2-hydroxyméthylaziridine
Aziridine 2	CH ₃	274.3	<i>N</i> -phtalimidoalanyl-2-hydroxyméthylaziridine
Aziridine 3	CH ₂ ph	350.4	<i>N</i> -phtalimidophénylalanyl-2-hydroxyméthylaziridine
Aziridine 4		375.4	<i>N</i> -phtaloyltryptophyl-2-hydroxyméthylaziridine

Streptomycine (100 ($\mu\text{g/ml}$) en présence ou en absence de la Con A (5 $\mu\text{g/ml}$) ou LPS (20 $\mu\text{g/ml}$).

Les essais sont réalisés en triple. Afin de déterminer les effets des aziridines sur la prolifération *in vitro* des lymphocytes, les cellules sont mises en culture en présence des quatre aziridines à différentes concentrations finales (0 μM -1 μM -10 μM -50 μM -500 μM -1mM), (**figure 3**). Les plaques sont ensuite mises à incuber 48 heures à 37°C, 5% de CO₂ (voir Annexe).

A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans des tubes secs. Les puits sont lavés avec le milieu RPMI 1640 afin de récupérer l'ensemble des cellules. La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de malassez), confirmée par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] et le dosage des protéines. Une prise aliquote des suspensions cellulaires est centrifugée à 6000 tours/min pendant 15 minutes. Les cellules (culot) servent à la détermination de la composition en acides gras des membranes des lymphocytes. Le surnageant sert au dosage des interleukines IL-2 et IL-6.

I.6.1. Comptage des lymphocytes

Le comptage des lymphocytes se fait à l'aide de la cellule de Malassez. Le principe est basé sur le décompte au microscope optique des cellules après coloration au bleu de Trypan, contenues dans un volume de suspension cellulaire déterminé et à dilution connue.

I.6.2. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT

La méthode du MTT est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des enzymes mitochondriales (succinate déshydrogénase) dans les cellules vivantes de

Puits	PCB			+ (Con A ou LPS)			+Aziridine			Aziridine +ConA ou LPS		
	●	●	●	●▼	●▼	●▼	●■	●■	●■	●▼■	●▼■	●▼■

- Suspension cellulaire sans l'agent mitogène
 - ▼ Concanavaleine A (5µg/ml) ou LPS (20µg/ml)
 - Aziridine (0µM-1µM-10µM-50µM-500µM-1mM)
- PCB: prolifération cellulaire basale

Figure 3 : Représentation schématique de la plaque d'incubation.

transformer les sels de tétrazolium (couleur jaune) en produits insolubles de formazan (couleur bleue violacée). La concentration de Formazan obtenue est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire. Cette technique permet de mesurer la viabilité et la prolifération lymphocytaire, et les résultats sont parallèles à ceux obtenus par la méthode de référence utilisant la thymidine radioactive incorporée dans l'ADN (Mosmann, 1983). La solution de MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] (Sigma, USA) est préparée à une concentration de 5 mg/ml dans le tampon phosphate (PBS, PH 7.5), filtrée puis conservée à 4° C à l'abri de la lumière (Voir Annexe).

Après isolement des lymphocytes par le ficoll et le lavage, une suspension cellulaire de 1×10^6 cellules/ml sert, à la préparation de la gamme étalon suite à différentes dilutions. 100µL de suspension cellulaire de la gamme étalon ou des différentes incubations (puits) sont incubés en présence de 10µL de MTT (5 mg/ml) à 37° C, 5% CO₂ pendant 3 heures. L'addition de 100 µL de HCL 0.04M dans l'isopropanol permet la dissolution des cristaux bleus Formazan. La lecture des densités optiques se fait au spectrophotomètre à 630 nm. La courbe étalon permet d'obtenir directement le nombre de cellules/ml. L'indice de prolifération (IP) est aussi calculé :

IP= densité optique des cellules stimulées/ densité optique des cellules non stimulées

NB : Cellules stimulées: cellules prélevées des puits après les incubations.

Cellules non stimulées: cellules provenant de la suspension cellulaire initiale avant incubation.

I.6.3. Dosage des protéines

Se fait selon la méthode de Lowry et al. (1951) (Voir Annexe).

Après incubation, récolte des suspensions cellulaires et centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 minutes, 50µL de tampon de lyse (NaOH 0.5 N) sont ajoutés au culot cellulaire. Après mélange et centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 minutes, 20µL du surnageant sont prélevés pour le dosage des protéines totales.

Pour la gamme étalon, l'albumine sérique bovine (SBA) est utilisée comme standard, (sigma chemical company, Saint Louis, MO).

I.7. Dosage des Interleukines

I.7.1. Dosage des Interleukines 2 (IL-2)

Le dosage des interleukines 2 (IL-2) se fait selon le protocole du kit ELIZA (Genzyme, Cambridge, MA, USA) pour IL2. Le principe est basé sur l'utilisation de deux anticorps : un anticorps monoclonal anti-IL-2 et un polyclonal conjugué à la biotine. Un revêtement d'anticorps monoclonal anti- IL-2 est administré dans les micropuits de la plaque ELISA. L'IL-2 présente dans l'échantillon ou le standard, se lie aux anticorps absorbés dans les micropuits. L'anticorps anti- IL2 polyclonal conjugué à la biotine est ajouté et se lie à IL2 capturés par le premier anticorps. L'anti-IL2 conjugué à la biotine non lié est enlevé pendant l'étape de lavage. La streptavidine-HRP est ajoutée et se lie à l'anti- IL2 conjugué à la biotine. Pour l'incubation suivante, la streptavidine-HRP non lié est enlevé durant le lavage, et la solution de substrat réagissant avec le HRP est ajoutée aux puits. Un produit coloré est formé proportionnellement à la quantité des IL2 présents dans l'échantillon. La réaction est terminée par l'addition d'acide et l'absorbance est mesurée à 450 nm. Une courbe étalon est préparée à partir du standard IL-2 fourni par le Kit de dosage.

I.7.2. Dosage des Interleukines 6 (IL-6)

Le principe du dosage des interleukines 6 (IL-6) repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IL-6 et un polyclonal anti-IL-6 conjugué à la biotine. La technique utilisée est comparable à celle du dosage des IL-2. La gamme étalon est préparée à partir d'un standard IL-6.

I.8. Détermination de la composition en acides gras des phospholipides membranaires

Une prise aliquote de lymphocytes initiaux ou stimulés sert à la détermination de la composition en acide gras des phospholipides membranaires. L'extraction des lipides se fait selon Bligh et Dyer (1959) ; grâce à un mélange méthanol/ chloroforme/Na Cl 2M (1/1/0.9 ; V/V/V).

La séparation des phospholipides se fait par :

Chromatographie sur couche mince : (CCM)

L'extrait lipidique est déposé sur les plaques de gel de silice (C 60, Merck, Allemagne). La migration se fait grâce à un mélange d'hexane, d'éther diéthylique et d'acide acétique (90/30/1 ; V/V/V). Après migration, la révélation se fait grâce aux vapeurs d'iode. Les phospholipides qui demeurent au niveau du dépôt, sont grattés et récupérés dans un tube en verre soviétique.

La composition en acides gras des phospholipides est déterminée par :

Chromatographie en phase gazeuse : (CPG)

Après addition d'une quantité connue de standard interne (acide héptadécanoïque : 17:0, $C_{17}H_{34}O_2$ dilué dans du benzène à 2 mg/ml), les acides gras sont saponifiés grâce à l'addition de NaOH méthanolique puis sont méthylés par le Bromotrifluorométhanol (BF_3). La séparation des différents acides gras est réalisée

par la suite par chromatographie en phase gazeuse (colonne capillaire en pyrex de 39m de longueur et 0.3m de diamètre interne, remplie avec du carbowax 20M, Applied Sciences Labs, State College, PA). Le chromatographe est équipé d'un injecteur de type ROS et d'un détecteur à ionisation de flamme relié à un intégrateur- calculateur Enica 21 (Delsi instruments, France). L'identification des acides gras est réalisée par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des standards d'acides gras (Elysiam, USA). La surface des pics d'acides gras est proportionnelle à leur quantité ; elle est calculée à l'aide d'un intégrateur.

I.9. Analyse de l'ADN

Les aziridines sont des agents alkylants. En raison de la présence d'anneau hétérocycle, les aziridines montrent une grande réactivité vers les réactifs nucléophiles et électrophiles. Afin de vérifier que les quatre nouvelles aziridines synthétisées dans notre laboratoire sont des substances alkylantes à l'ADN, une électrophorèse sur gel d'agarose avec révélation de l'ADN par l'acridine orange ou le bleu de Nile, est réalisée.

Cette technique d'électrophorèse sur gel ou " test des comètes" permet de mettre en évidence la mobilité électrophorétique de l'ADN et les dommages de l'ADN au sein de la cellule entière (Fairbairn et al., 1995 ; Olive et al., 1990). Cette méthode, simple et rapide, est basée sur les propriétés de migration de l'ADN dans un champ électrique. Après électrophorèse, l'ADN est visualisé au moyen d'un marqueur spécifique, l'acridine orange ou le bleu de Nile. L'application d'un traitement alcalin permet en outre de mettre en évidence les altérations de l'ADN (coupures simples et doubles brins). Après la coloration, l'image de l'électrophorèse est celle d'une boule pour l'ADN intact. A l'inverse, lorsque la structure de l'ADN est altérée, l'image ressemble

à une comète avec, derrière la " boule" d'ADN intact, un halo en forme de traînée (Singh et al., 1988). Ainsi, toute substance alkylante est susceptible de réduire la mobilité électrophorétique de l'ADN et créer l'image comète.

I.9.1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée par un mélange chloroforme/ alcool isoamylique selon la méthode de Sambrook et al. (1989). Le principe consiste à traiter le culot cellulaire dans un premier temps par un Tampon de lyse (Tris 20 mM pH 7,5/MgCl₂ 5 mM). Après addition d'un mélange de détergeant SDS à 10 % et de protéinase K (10 mg/ml), et incubation 10 heures à 56 °C, le culot contenant l'ADN est récupéré après une centrifugation à 3000 trs/minutes. Après purification par un mélange chloroforme/ alcool isoamylique (3 :1 v/v) et une autre centrifugation à 6000 trs/minutes, l'ADN est précipité par l'addition d'une solution d'éthanol absolu et de NaCl 5M, puis conservé dans le tampon de conservation (Tris / EDTA, PH 7.6).

I.9.2 Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose

L'ADN est une molécule chargée négativement, qui soumise à un champ électrique peut diffuser au sein d'un hydrogel d'agarose. Un gel d'agarose 1 % est préparé par dissolution à chaud de l'agarose (p/v) dans un tampon de migration TBE (45 mM Tris-Borate, 1mM EDTA) (voir annexe). Afin de densifier l'ADN et de visualiser sa migration, un tampon de charge (voir annexe) est ajouté à la solution d'ADN avant les dépôts dans les puits immergés dans le tampon. La migration électrophorétique se fait sous une tension de 100 volts pendant une heure. Les gels sont par la suite colorés au bleu de Nile ou à l'acridine orange pendant 2 heures. Les bandes d'ADN apparaissent en bleu foncé sur un fond bleu clair (coloration au bleu de Nile). L'utilisation du marqueur fluorescent, l'acridine orange, nécessite une observation des gels sous

lumière UV à l'aide d'une caméra (gel doc 2000, BIORAD. Laboratoire d'ADN INMED, Université de Provence, France).

II. Etude in vivo : Essais de toxicité aigue

Le but de cette étude est d'évaluer les effets toxiques (qualitatifs et quantitatifs) sur l'ensemble de l'organisme d'une dose unique de la substance aziridine testée. L'expérimentation directe sur l'homme n'étant pas possible pour des raisons éthiques évidentes, le rat demeure l'animal le plus utilisé dans les études de toxicité aigue. Le protocole expérimental est effectué conformément aux lignes directrices de l'OCDE (organisation de coopération et de développement économique) et de la FDA (Food and drug administration). Il faut noter que lors de la découverte de toute substance à pouvoir thérapeutique, les tests de toxicités aigues constituent la première étape des expérimentations précliniques qui représentent un préalable indispensable à tout essai chez l'être humain.

II.1 Animaux

L'étude est réalisée sur des rats mâles adultes, de type « Wistar » âgés de 3 mois. L'étude de la littérature sur les essais de toxicité aigue permet de conclure qu'il y a peu de différences de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a une différence, les femelles sont en général légèrement plus sensibles (Lipnick et al., 1995 ; OCDE, 2001). Au début de l'essai, le poids de chaque rat est choisi se situant dans un intervalle de $\pm 20\%$ du poids moyen de tous les animaux utilisés dans cette étude, conformément aux principes régissant la recherche sur les animaux selon l'OCDE et le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) (CCPA, 1993 ; OCDE, 2001).

Les animaux sont répartis dans des cages métaboliques placées dans l'animalerie (Département de biologie) maintenue à une température de 25° C à 30° C et un taux d'humidité compris entre 60% et 70 %. Pour l'alimentation des animaux, on utilise la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les rats sont marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater à leurs conditions de vie pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

II.2 Détermination de la dose létale 50 (DL50) et Observation des manifestations de l'intoxication aigue

L'étude de la mortalité après une seule administration de l'aziridine permet de déterminer la dose Létale 50 (DL50), la dose qui tue 50% des animaux traités dans un temps déterminé de 14 jours. L'OCDE recommande d'administrer la substance à des animaux répartis en plusieurs groupes et ce, à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité s'échelonnant entre 0 et 100 %. Les doses administrées doivent être comprises entre 5 mg/Kg et 5 g/kg de poids corporel pour permettre de situer les substances testées sur l'échelle comparative de toxicité de substances chimiques de Hodge et Sterner, 1949 (Tableau 3) (Claude, 1988 ; OCDE, 2001).

L'étude est faite sur différents lots de 6 rats mâles. Les rats de chaque lot reçoivent des injections intra péritonéales de la substance chimique d'aziridine à des doses différentes. En général, il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée (1ml par 200 g de poids corporel), en faisant varier la concentration de la solution préparée. A partir d'une solution mère d'aziridine à 1 M, différentes solutions à concentrations croissantes sont préparées utilisant l'eau

Tableau 3 : Echelle de toxicité de substances chimiques (d'après Hodge et Sterner, 1949)

Classe de toxicité	DL50 chez la souris ou le rat	Doses toxiques pour un enfant (12,5 kg)
Extrêmement toxique	<1 mg/kg	Environ 8 mg (il est généralement suffisant de goûter le produit pour provoquer une intoxication)
Très toxique	1 à 50 mg/kg	Une petite gorgée ou 500 µl
Moyennement toxique	50 à 500 mg/kg	Une cuillerée à café ou 10 ml
Faiblement toxique	0,5 à 5 g/kg	Un coquetier
Pratiquement non toxique	5 à 15 g/kg	Environ 180g
Relativement sans danger	>15 g/kg	>180 g

physiologique pour les dilutions. Les différents lots de rats sont répartis comme suit :

⇒ 1^{er} lot témoin : rats recevant une injection intra péritonéale de 1 ml d'eau physiologique à 9 ‰ de Na Cl par 200 g de poids corporel.

⇒ 2^{ème} au 6^{ème} lots expérimentaux : rats recevant une injection intra péritonéale de 1 ml d'aziridine à une concentration de 5 mM, 20mM, 50mM, 75mM, 100mM, par 200 g de poids corporel.

Ainsi les doses injectées aux différents rats sont :

- pour l'aziridine 1 : les 2^{ème} au 6^{ème} lots de rats reçoivent une dose de 6.5 mg/kg, 26 mg/kg, 65 mg/kg, 97.5 mg/kg, 130 mg/kg.
- pour l'aziridine 2 : les 2^{ème} au 6^{ème} lots de rats reçoivent une dose de 6.85 mg/kg, 27.4 mg/kg, 68.5 mg/kg, 102.75 mg/kg, 137 mg/kg.
- pour l'aziridine 3 : les 2^{ème} au 6^{ème} lots de rats reçoivent une dose de 8.75 mg/kg, 35 mg/kg, 87.5 mg/kg, 131.25 mg/kg, 175 mg/kg.
- pour l'aziridine 4 : les 2^{ème} au 6^{ème} lots de rats reçoivent une dose de 9.35 mg/kg, 37.4 mg/kg, 93.5 mg/kg, 140.25 mg/kg, 187 mg/kg.

Après administration de la substance, les rats sont observés pendant 14 jours, plusieurs fois par jour. Selon les directives de l'OCDE (2001) et du CCPA (1993), l'observation des animaux est basée sur les cinq paramètres suivants :

1. Variation du poids de l'animal (et variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) ;
2. Apparence physique externe ;
3. Signes cliniques mesurables (ex.: changements des rythmes cardiaque, respiratoire,...) ;
4. Changement du comportement ;

5. Réponses comportementales aux stimuli externes (ex. : bruit, variation de l'intensité lumineuse).

On note ainsi la mortalité mais aussi toutes les modifications comportementales telles que les troubles de l'équilibre, la posture, le grattage, l'aspect des poils, la chute de poils, l'aspect des fèces, la présence de diarrhées, la variation du poids corporel, l'agressivité, les saignements, l'hypersalivation, la variation de l'ingestion de nourriture et d'eau, la température rectale. Les urines sont récupérées puis centrifugés à 3000 t/min, et conservées à 4° C pour réaliser les tests urinaires.

Les animaux encore vivants à la fin de l'expérimentation sont pesés puis anesthésiés au pentobarbital sodique à 6,5% (0,1 ml par 100 g de poids corporel), après 12 h de jeûne. Le sang est prélevé par ponction dans l'aorte abdominale. Une quantité de sang prélevé est récupérée dans des tubes à EDTA pour les tests hématologiques et une autre partie est recueillie dans des tubes secs pour les tests biochimiques. Les organes (le foie, la rate, le muscle gastrocnémien, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux) sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 9%, ensuite pesés. Une partie aliquote des différents organes est introduite dans un liquide fixateur (liquide de Bouin) pour l'étude histologique. Les restes sont conservés à -20°C, en vue des dosages biochimiques (**figure 4**).

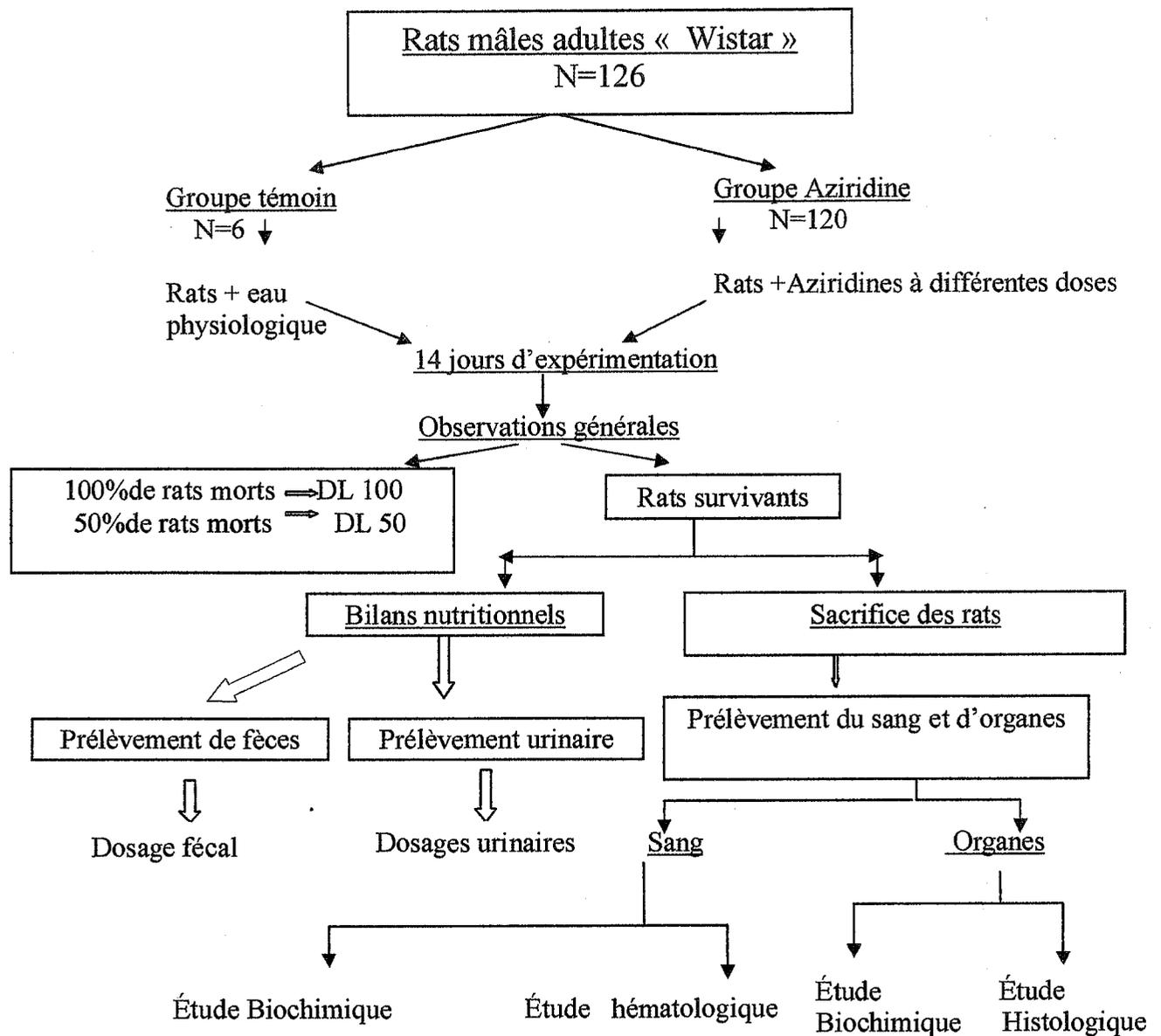


Figure 4 : Protocole expérimental

II.3. Analyse des paramètres hématologiques

II.3.1. Numération des globules rouges et des globules blancs

Le dénombrement des hématies et des leucocytes se fait par les cellules de Thomas, au moyen d'un microscope optique à un grossissement de 10 x 40. Les résultats sont exprimés en nombre d'hématie ($10^6/\text{mm}^3$ de sang) ou de leucocytes ($10^3/\text{mm}^3$ de sang).

II.3.2. Dosage de l'hémoglobine

L'hémoglobine est dosée par la méthode colorimétrique de Drabkin (cyanométhémoglobine). Le Fe^{+2} de l'hémoglobine est oxydé en Fe^{+3} de la méthémoglobine par le ferricyanure de potassium qui est ensuite transformée en cyanométhémoglobine un composé stable par le cyanure de potassium (KCN). L'absorbance du cyanométhémoglobine directement proportionnelle à la concentration en hémoglobine, est mesurée à 546 nm.

II.4. Analyse des paramètres biochimiques

II.4.1 Détermination des teneurs en créatinine

La créatinine sérique ou urinaire est dosée par la méthode de Jaffé basée sur la réaction de l'acide picrique avec la créatinine en milieu basique formant un complexe coloré en jaune orange. L'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm (Kit Boehringer, Mannheim, Allemagne).

II.4.2 Détermination des teneurs en urée

L'urée sérique ou urinaire est dosée par une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation du diacétylmonooxime et des ions Fe^{+3} (Kit Prochima). En présence d'ions Fe^{+3} et d'un réducteur, l'urée réagit avec le diacétylmonooxime pour donner un complexe coloré en rose. La coloration obtenue est proportionnelle à la quantité d'urée

présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 525 nm.

II.4.3 Détermination des teneurs en acide urique

L'acide urique sérique ou urinaire est dosé par une méthode colorimétrique.

L'acide urique est dosé par réduction d'un réactif phosphotungstique en milieu alcalinisé par le carbonate de sodium. L'intensité de la coloration bleue obtenue est mesurée à une longueur d'onde égale à 620 nm (Kit Prochima).

II.4.4. Détermination des teneurs en protéines totales

Les protéines totales sont dosées par la méthode de Lowry et al. (1951) utilisant l'albumine sérique bovine comme standard (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), sur le sérum total et les organes (après broyage d'une partie aliquote dans du tampon phosphate/ EDTA, pH 7,2, ajout de lauryl sulfate de sodium (SDS 1%) (1/1, v/v), et centrifugation à 3000 t/min pendant 10 min).

II.4.5. Détermination des teneurs en glucose

Le glucose sérique est déterminé par la méthode enzymatique et colorimétrique en présence de la glucose oxydase (GOD). Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase et de phénol, oxyde un chromogène (Le 4- amino-antipyrine) incolore en couleur rouge à structure quinonéimine. La coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en glucose présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 505 nm (Kit Prochima).

II.4.6 Détermination des teneurs en cholestérol, triglycérides et phospholipides

Le cholestérol total et les triglycérides sont dosés par des méthodes enzymatiques (Kits Boehringer, Mannheim, Allemagne), sur le sérum total, et les organes (après leur broyage, comme précédemment décrit).

Les phospholipides sont déterminés à partir du dosage de leur contenu en phosphore par le Kit bioMérieux (sa, Lyon, France) dont le principe est basé sur la mesure de l'absorbance du complexe phosphomolybdique (formé à partir des ions phosphates et du molybdate d'ammonium en milieu acide).

II.4.7. Détermination des lipides totaux des organes (le foie, la rate, le muscle gastrocnémien, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux).

L'extraction lipidique se fait à partir des organes par la méthode de Folch et al. (1957) après le broyage d'une partie aliquote de l'organe (300 mg) et extraction par un mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v). Après évaporation totale du solvant, les lipides totaux sont pesés.

II.4.8. Détermination de l'activité enzymatique des transaminases (TGO, TGP)

Les transaminases permettent le transfert du groupement aminé d'un acide aminé sur un acide α cétonique. L'acide aminé est alors transformé en acide cétonique correspondant et l'acide α cétonique en acide aminé. Les deux principales réactions de transamination sont catalysées par les transaminases glutamo-oxaloacétique (TGO) et glutamo-pyruvique (TGP). La détermination des activités enzymatiques des transaminases se fait au niveau des organes (foie, cœur, rein, muscle) et permet d'apprécier l'atteinte tissulaire et la cytolyse (Valdiguie, 2000).

L'enzyme transaminase catalyse le transfert du groupe amine de l'aspartate (pour la TGO) ou de l'alanine (pour la TGP) vers l'oxaloglutarate avec formation de glutamate et d'oxaloacétate (pour la TGO) ou du pyruvate (pour la TGP). Les mesures sont effectuées à l'aide de réactions couplées pour permettre l'utilisation du coenzyme NADH/H⁺ dont on mesure la diminution d'absorbance. Ainsi, l'oxaloacétate est réduit en malate ou le pyruvate en lactate grâce à des déshydrogénases (MDH ou LDH)

couplées à NADH/H⁺. La vitesse d'oxydation du NADH est proportionnelle à l'activité enzymatique des transaminases. Elle est déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

II.5. Bilans nutritionnels

Dans les essais de première administration à l'homme, la première dose administrée de toute nouvelle substance active ne doit entraîner aucun effet toxique détectable à court terme (Claude, 1988 ; Gir, 2005 ; Afssaps, 2006).

Dans cet objectif, la première dose sera choisie sur la base des données animales d'exposition à la nouvelle substance et notamment l'exposition obtenue à la dose sans effet toxique (c'est-à-dire la NOAEL ; No Observed Adverse Effect Level). Cette dose ne doit en aucun cas affecter le comportement alimentaire et les bilans nutritionnels (Gir, 2005 ; Afssaps, 2006).

Afin d'étudier l'effet des aziridines testées sur le comportement alimentaire et le statut nutritionnel chez les rats Wistar, les bilans nutritionnels sont réalisés sur des rats ayant reçu une dose d'aziridine choisie sans effet toxique (5 mM, 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 ; 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4).

Après injection d'aziridines, les rats sont mis dans des cages à métabolisme individuelles et sont suivis durant sur une période de 4 semaines.

Le poids des rats est noté quotidiennement. La nourriture ingérée est pesée tous les jours. Les urines et les fèces sont collectées durant des périodes de 7 jours, au cours de la première semaine (BI) et la dernière semaine (BII) du mois d'expérimentation.

Les urines sont centrifugées puis conservées à 4°C après l'ajout du thymol/isopropanol à 10%. Les fèces sont séchées à l'étuve à 60°C pendant 24h puis pesés, finement broyés et conservés à -20°C, en vue des différents dosages.

II.5.1. Détermination du contenu en azote

Le contenu en azote des régimes, des urines et des fèces est déterminé par la méthode de Kjeldhal (1883) qui comporte une minéralisation, une distillation et une titration.

Les bilans azotés (BA), les coefficients d'utilisation digestive de l'azote (CUD_N) et le rapport d'efficacité nutritionnelle (REN), sont calculés selon les formules suivantes :

$$\text{CUD}_N (\%) = [(N \text{ ingéré} - N \text{ fèces}) / N \text{ ingéré}] \times 100$$

$$\text{BA} (\%) = [(N \text{ ingéré} - (N \text{ urines} + N \text{ fèces})) / N \text{ ingéré}] \times 100$$

$$\text{REN} = \text{Gain de poids (g)} / \text{Nourriture consommée pour obtenir ce gain de poids (g)}$$

II.5.2. Détermination des teneurs en lipides

Les lipides des régimes et des fèces sont extraits par un mélange chloroforme : méthanol (2 : 1 / v : v) selon la méthode de Folch et al. (1957). Après évaporation totale du chloroforme, l'extrait lipidique (lipides totaux) est pesé plusieurs fois, jusqu'à poids constant.

Les coefficients d'utilisation digestive apparente des lipides (CUD_L) sont déterminés.

$$\text{CUD}_L (\%) = [(\text{Lipides ingérés} - \text{Lipides fécaux}) / \text{lipides ingérés}] \times 100.$$

II.6. Etude histologique

Après sacrifice des rats et prélèvement sanguin, le foie, le muscle gastrocnémien, le tissu adipeux, le cerveau, la rate, le cœur et le rein sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 9‰, ensuite pesés. Une partie aliquote des différents organes est immédiatement introduite pendant 12 heures dans le liquide de Bouin permettant l'immobilisation des structures et constituants cellulaires. L'inclusion des tissus dans

la paraffine permet la réalisation des coupes fines et régulières. La paraffine étant hydrophobe, le prélèvement d'organe doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degrés croissants) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage, qui infiltre le tissu. Une fois immergées dans la paraffine, les coupes fines sont préparées avec un microtome. Ces coupes subissent ensuite un ensemble de traitements destinés à en colorer les éléments plus au moins spécifique. La coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (Xylène) puis dans des alcools de titre décroissant. Après réhydratation, la coupe est colorée à l'hématoxyline-Eosine. La préparation est alors prête pour l'observation microscopique (Laboratoire d'histologie, INSERM U846, Lyon).

III. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Statsoft, Paris, France). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

Les différences sont considérées significatives à *, $P < 0,05$ et hautement significative à ** $P < 0,01$.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I. Effets in vitro des aziridines de synthèse sur la prolifération des lymphocytes humains stimulés par les agents mitogènes

I.1. Structure et nombre des leucocytes

Sur les frottis colorés au May-Grunwald-Giemsa (**figure 5**), les lymphocytes apparaissent arrondis, d'aspect normal, avec un noyau sphérique volumineux occupant 90 % du volume de la cellule et au cytoplasme très réduit aussi bien chez les patientes atteintes de cancer du sein que chez les femmes saines volontaires considérées comme témoins. Les polynucléaires apparaissent arrondis caractérisés par un noyau multilobé, comportant dans leur cytoplasme des granulations.

Cependant, l'analyse de la formule leucocytaire révèle, chez les femmes atteintes de cancer du sein, une diminution significative des globules blancs, des polynucléaires, des lymphocytes et des monocytes, comparées aux femmes témoins (**Tableau 4**).

I.2- Effets des aziridines sur la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B

Le modèle de culture cellulaire in vitro utilisé dans cette étude permet d'examiner les effets des quatre aziridines testées à différentes concentrations sur la prolifération des lymphocytes humains stimulés par des agents mitogènes. La prolifération des lymphocytes des femmes volontaires en bonne santé (n = 10) et des femmes atteintes de cancer du sein (n = 10) incubés avec ou sans l'aziridine, déterminée par le comptage cellulaire, la méthode du MTT, l'indice de prolifération et les teneurs en protéines totales, est représentée dans les **figures 6-17** et les **Tableaux A2- A12** (en Annexes)

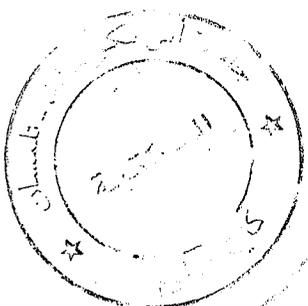


Tableau 4: Valeurs de la formule leucocytaire chez les témoins et les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins (n=10)	Femmes Cancéreuses (n=10)
Globules Blancs /mm ³	8000 ± 25.40	2500 ± 19.70 **
Lymphocytes /mm ³	2880 ± 30	1250 ± 12**
Polynucléaires /mm ³	4880 ± 54.10	1050 ± 38.12**
Monocytes /mm ³	240 ± 10.3	200 ± 7.40*

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des valeurs obtenues chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. Les comparaisons entre témoins et patientes cancéreuses sont réalisées par le test ANOVA et le test "t" de student.

* P< 0,05

** P< 0,01

Chez les témoins: les aziridines testées, l'aziridine 1 (*N*-phtalimidoglycyl-2-hydroxyméthylaziridine), l'aziridine 3 (*N*-phtalimidophénylalanyl-2-hydroxyméthylaziridine) et l'aziridine 4 (*N*-phtaloyltryptophyl-2-hydroxyméthylaziridine) stimulent de manière significative la prolifération des lymphocytes T et B d'une façon dose-dépendante, exprimée en nombre de cellules par puit d'incubation (**figures 6,8,9**) ou par l'indice de prolifération, IP (**figures 10,12,13**). Cependant, l'aziridine 2 (*N*-phtalimidoalanyl-2-hydroxyméthylaziridine) n'a aucun effet sur la prolifération basale des lymphocytes en l'absence des mitogènes, à n'importe quelle concentration utilisée (**figures 7,11**).

D'autre part, nous avons déterminé, les effets des quatre aziridines sur la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B stimulés par leurs mitogènes respectifs (Con A et LPS). La présence du mitogène stimule considérablement la prolifération des lymphocytes T (pour la Con A) et des lymphocytes B (pour la LPS). Ceci est indiqué par l'augmentation significative du nombre de cellules (**figures 6-9**) et de l'indice de prolifération en présence des agents mitogènes (**figures 10-13**). L'addition de l'aziridine potentialise l'effet de la Con A et de la LPS puisqu'une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes est constatée. En effet, l'aziridine 1, l'aziridine 3 et l'aziridine 4 à une concentration comprise entre 1 μ M et 1 mM induisent une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes T stimulées par la Con A et de la prolifération des lymphocytes B stimulées par la LPS. Cet effet est dose-dépendant. Par contre, la prolifération des lymphocytes T et B est significativement réduite d'une façon dose dépendante avec l'aziridine 2 chez les femmes témoins (**figures 7,11**).

Les teneurs en protéines cellulaires sont également analysées avant et après chaque incubation. L'analyse des résultats montre que l'aziridine entraîne des variations des teneurs en protéines cellulaires parallèles à celles observées concernant la prolifération lymphocytaire (**figures 14-17**). La prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B exprimée par le contenu des protéines des cellules ($\mu\text{g/puit}$) suit le même profil que celle exprimée par les deux autres indices de la lymphoprolifération. En résumé, les teneurs en protéines des lymphocytes incubés sans les mitogènes et sans l'aziridine sont de $35 \pm 3.6 \mu\text{g/puit}$ à $38 \pm 4.9 \mu\text{g/puit}$; et augmentent jusqu'à $280 \pm 28.7 \mu\text{g/puit}$ à $320 \pm 38.5 \mu\text{g/puit}$ en présence des mitogènes. L'aziridine 1, l'aziridine 3 et l'aziridine 4 provoquent une augmentation dose dépendante des teneurs en protéines des lymphocytes T et des lymphocytes B (**figures 14, 16,17**). Par contre, l'aziridine 2 produit une diminution des teneurs en protéines des lymphocytes d'une manière dose-dépendante, parallèle à leurs effets immunomodulateurs (**figure 15**).

Chez les femmes cancéreuses : la prolifération cellulaire in vitro, basale ou stimulée par les mitogènes, est réduite suite à la diminution du nombre des lymphocytes T et B chez les femmes cancéreuses comparées aux femmes témoins. L'addition de l'aziridine 1, l'aziridine 3 et l'aziridine 4 stimulent la prolifération puisqu'une augmentation significative du nombre des lymphocytes T et B (**figures 6,8,9**) et de l'IP (**figures 10,12,13**), ainsi qu'une augmentation des teneurs en protéines des lymphocytes (**figures 14,16,17**) sont constatées en présence des aziridines à une concentration comprise entre $1\mu\text{M}$ et 1mM .

L'aziridine 2 agit chez les femmes cancéreuses de la même façon que chez les témoins à savoir une diminution significativement du nombre des lymphocytes T et

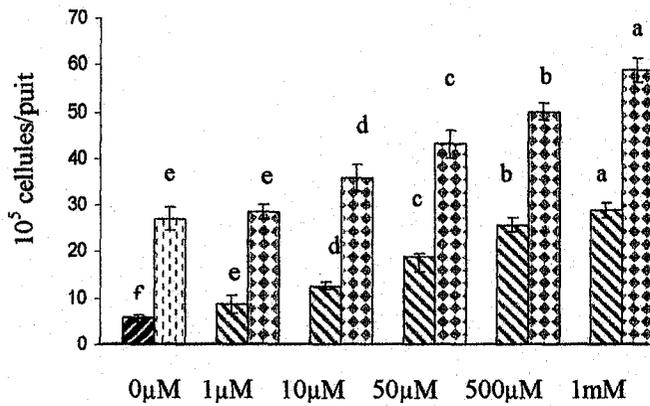
B et de l'IP (**figures 7,11**). Une diminution des teneurs en protéines des lymphocytes T et B est aussi observée en présence de l'aziridine 2 (**figure 15**).

I.3. Effets des aziridines sur la production d'interleukines 2 et 6 (IL-2, IL-6)

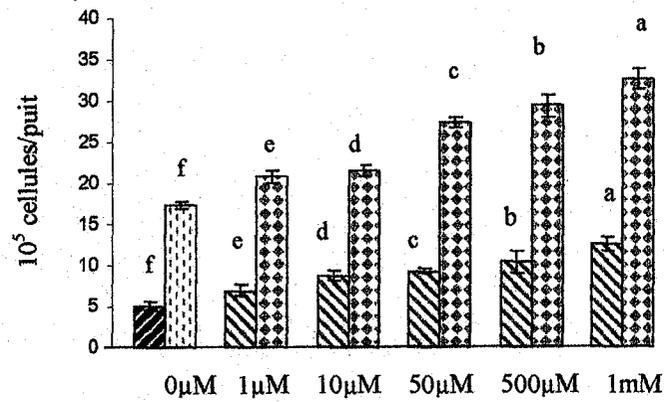
Chez les témoins : Les agents mitogènes (ConA et LPS) induisent une augmentation hautement significative de la production des IL-2 par les lymphocytes T et des IL-6 par les lymphocytes B, comparée à l'état basal. L'addition de l'aziridine 1 ou de l'aziridine 3 ou de l'aziridine 4 provoque une forte stimulation de la production des IL-2 et des IL-6 ; l'effet est dose dépendant (**figures 17, 20,21**). Cependant, une diminution de la production d'IL-2 et d'IL-6 est notée en présence de l'aziridine 2 aux concentrations allant de 50 μ M à 1mM (**figure 19**).

Chez les femmes cancéreuses : la production des interleukines 2 (IL-2) et des interleukines 6 (IL-6) est réduite chez les femmes cancéreuses comparées aux femmes témoins (**figures 18-21**). Les aziridines agissent de la même façon chez les cancéreuses que chez les femmes témoins. Ainsi, chez les femmes cancéreuses, une stimulation de la production des IL-2 et des IL-6 est notée en présence de l'aziridine 1, l'aziridine 3 et l'aziridine 4. Cependant, une diminution de la production d'IL-2 et d'IL-6 est notée en présence de l'aziridine 2 (**figure 19**). La réduction de la production des interleukines par l'aziridine 2 est en général de 85 % quelque soit la concentration d'aziridine 2 utilisée, allant de 50 μ M à 1mM.

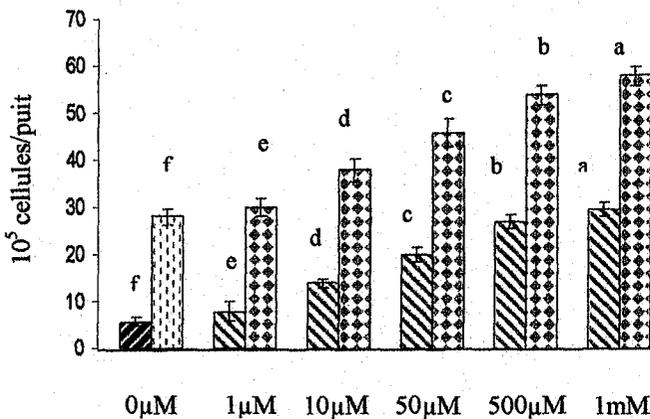
A Témoin



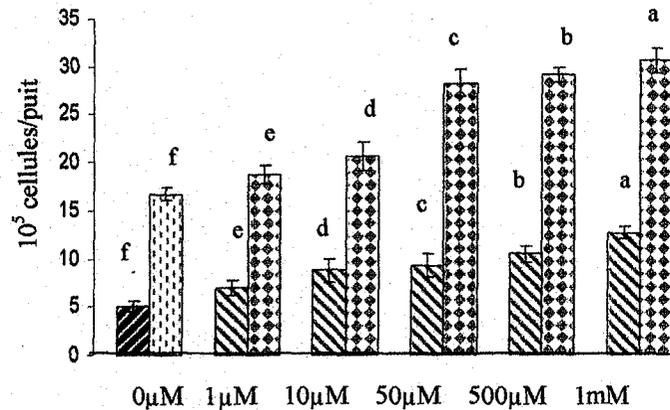
A Cancer



B Témoin



B Cancer



Concentration de l'aziridine 1 en culture

Témoin sans mitogène
 Témoin avec ConA (A) ou LPS (B)
 Aziridines
 Aziridine + Con A (A) ou LPS (B)

Figure 6 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 1 sur la prolifération des lymphocytes (nombre de cellules / puit) stimulée par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P < 0,05).

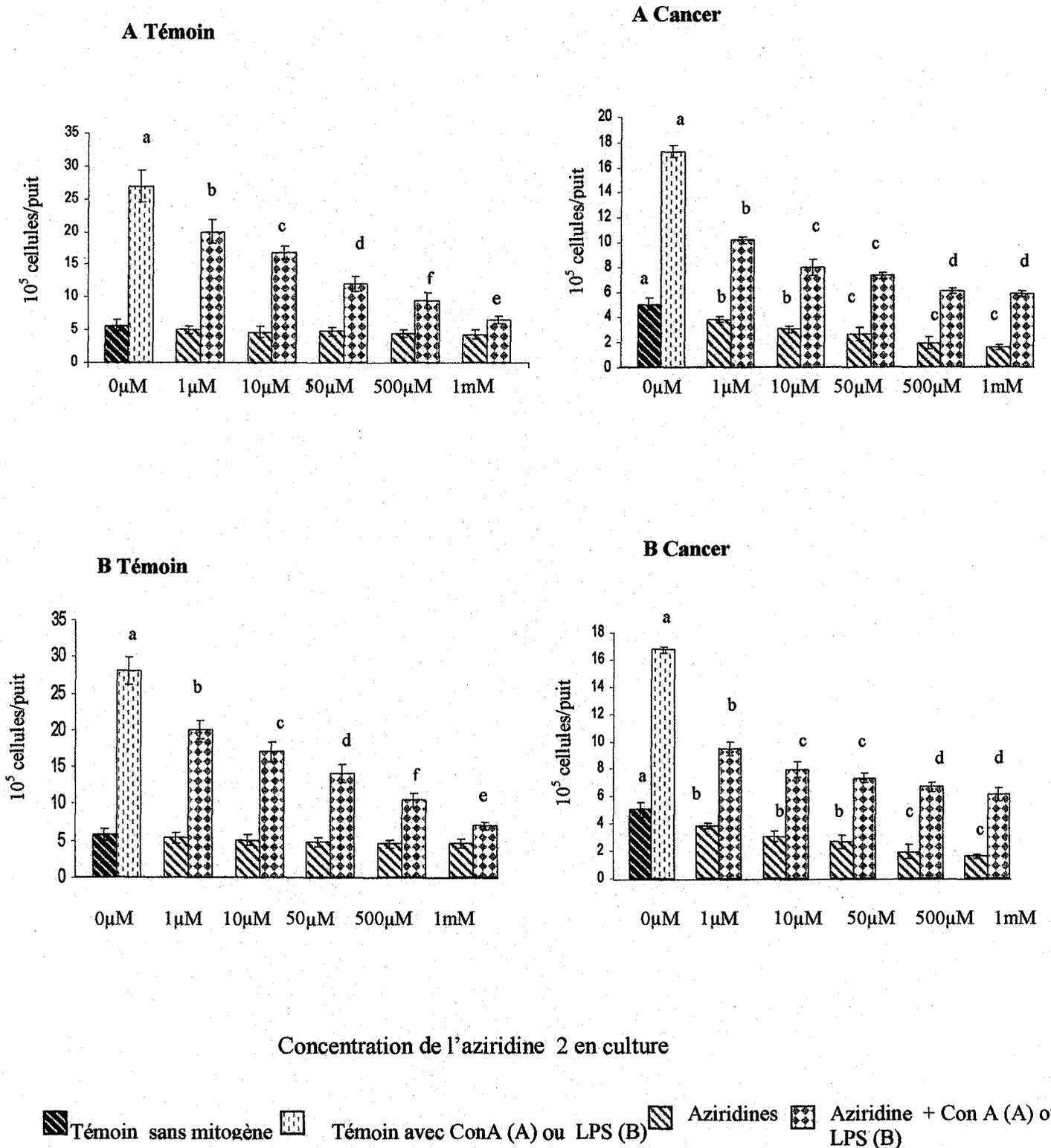


Figure 7: Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 2 sur la prolifération des lymphocytes (nombre de cellules / puit) stimulée par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).

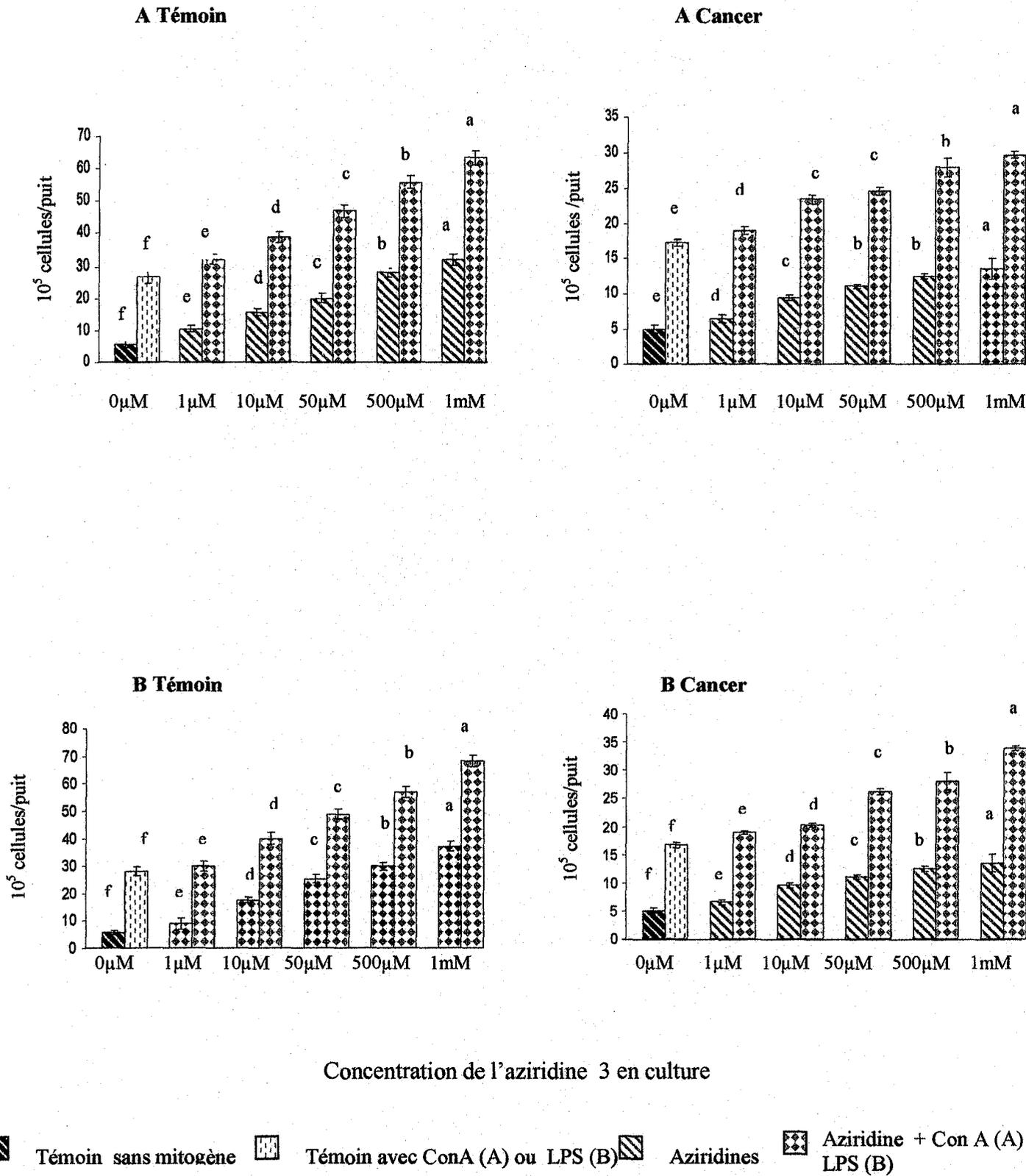
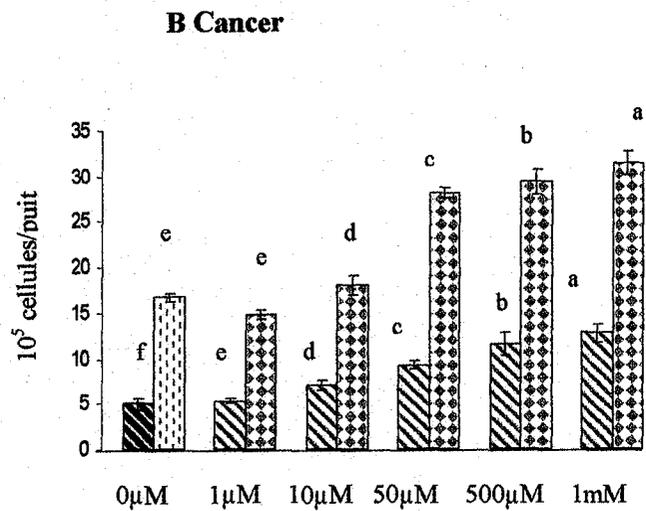
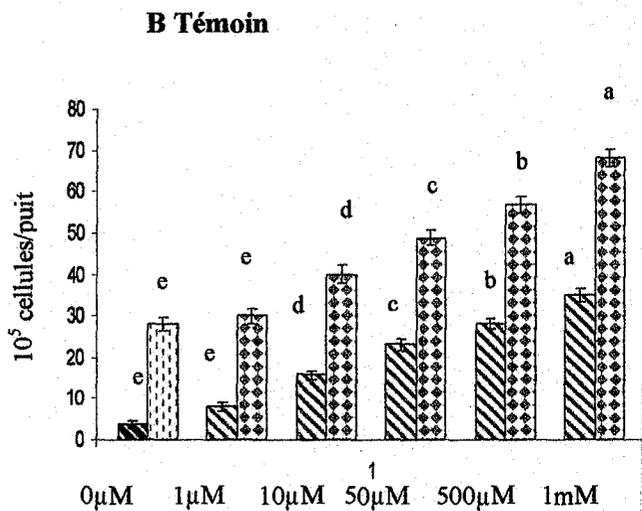
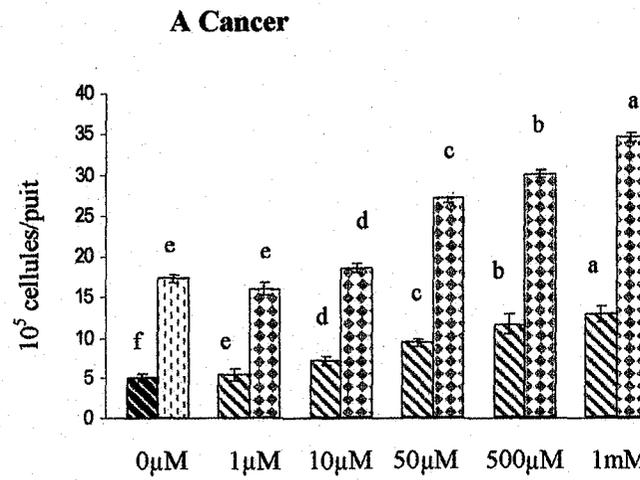
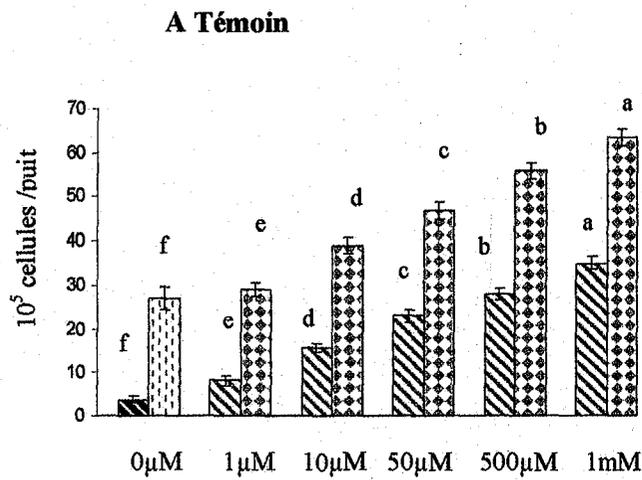


Figure 8 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 3 sur la prolifération des lymphocytes (nombre de cellules / puit) stimulée par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).



Concentration de l'aziridine 4 en culture



Témoin sans mitogène



Témoin avec ConA (A) ou LPS (B)



Aziridines



Aziridine + Con A (A) ou LPS (B)

Figure 9: Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 4 sur la prolifération des lymphocytes (nombre de cellules / puit) stimulée par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).

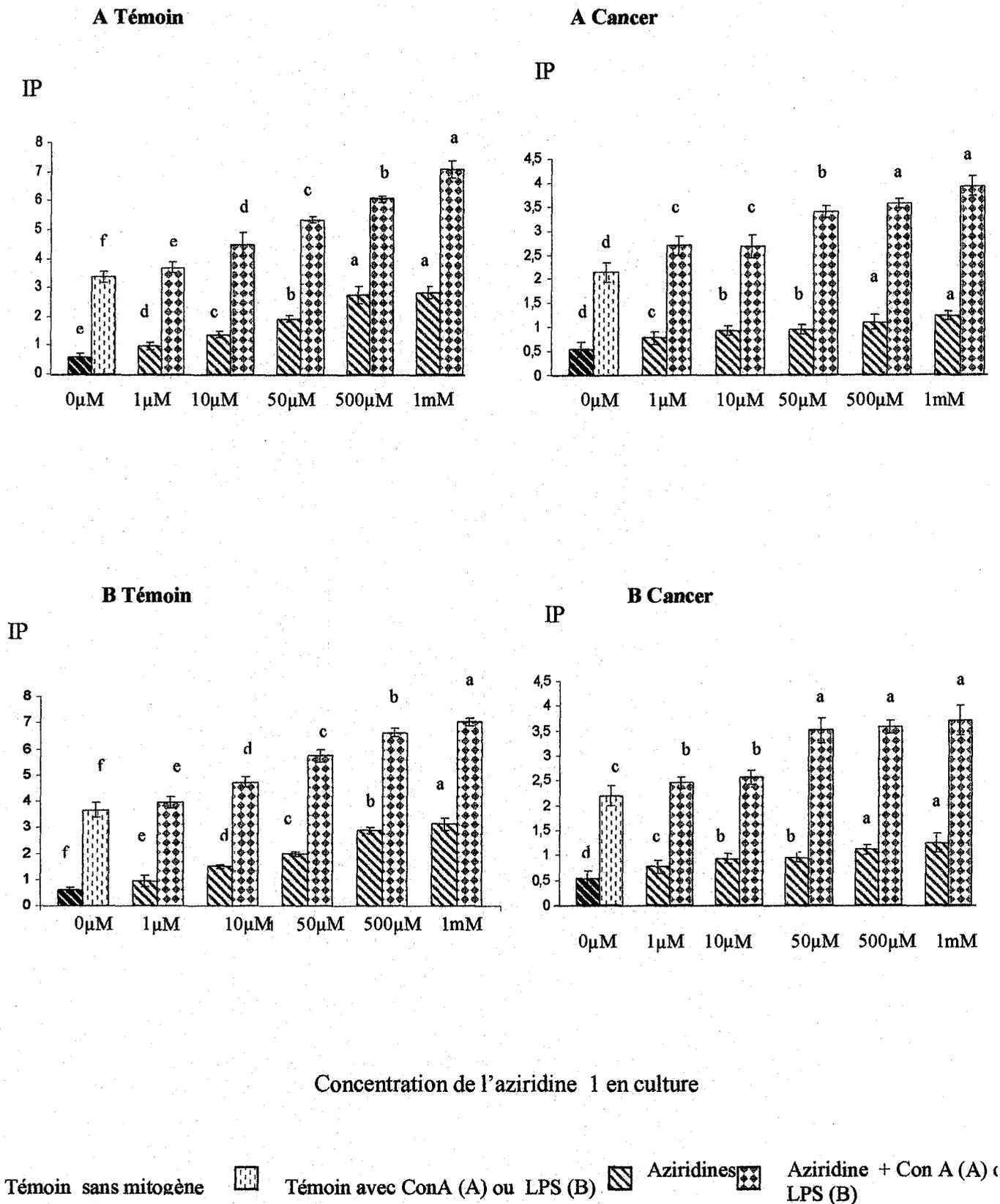


Figure 10 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 1 sur l'indice de prolifération des lymphocytes stimulés par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. L'indice de prolifération correspond au rapport de la densité optique des cellules stimulées sur la densité optique des cellules non stimulées. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).

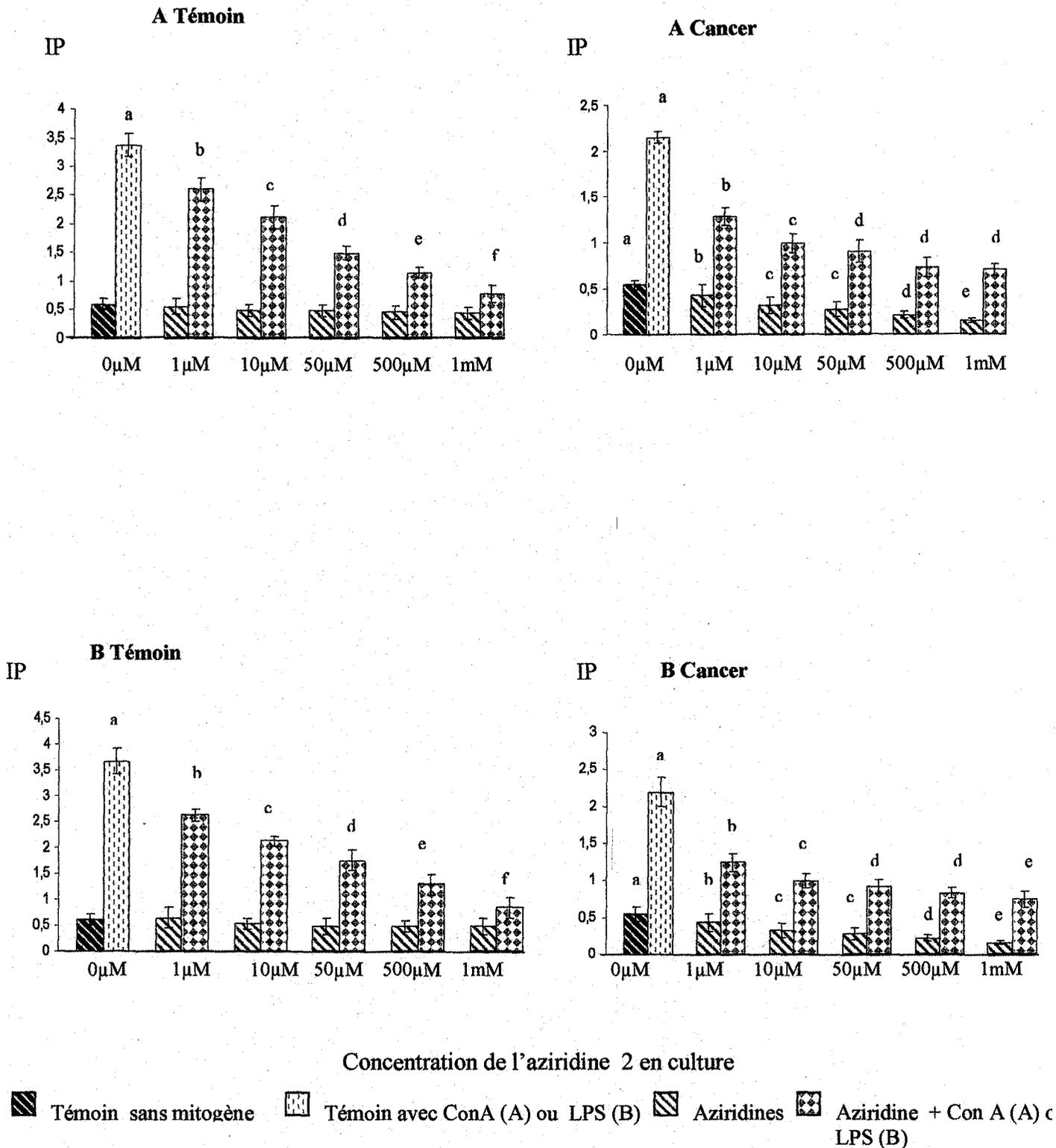
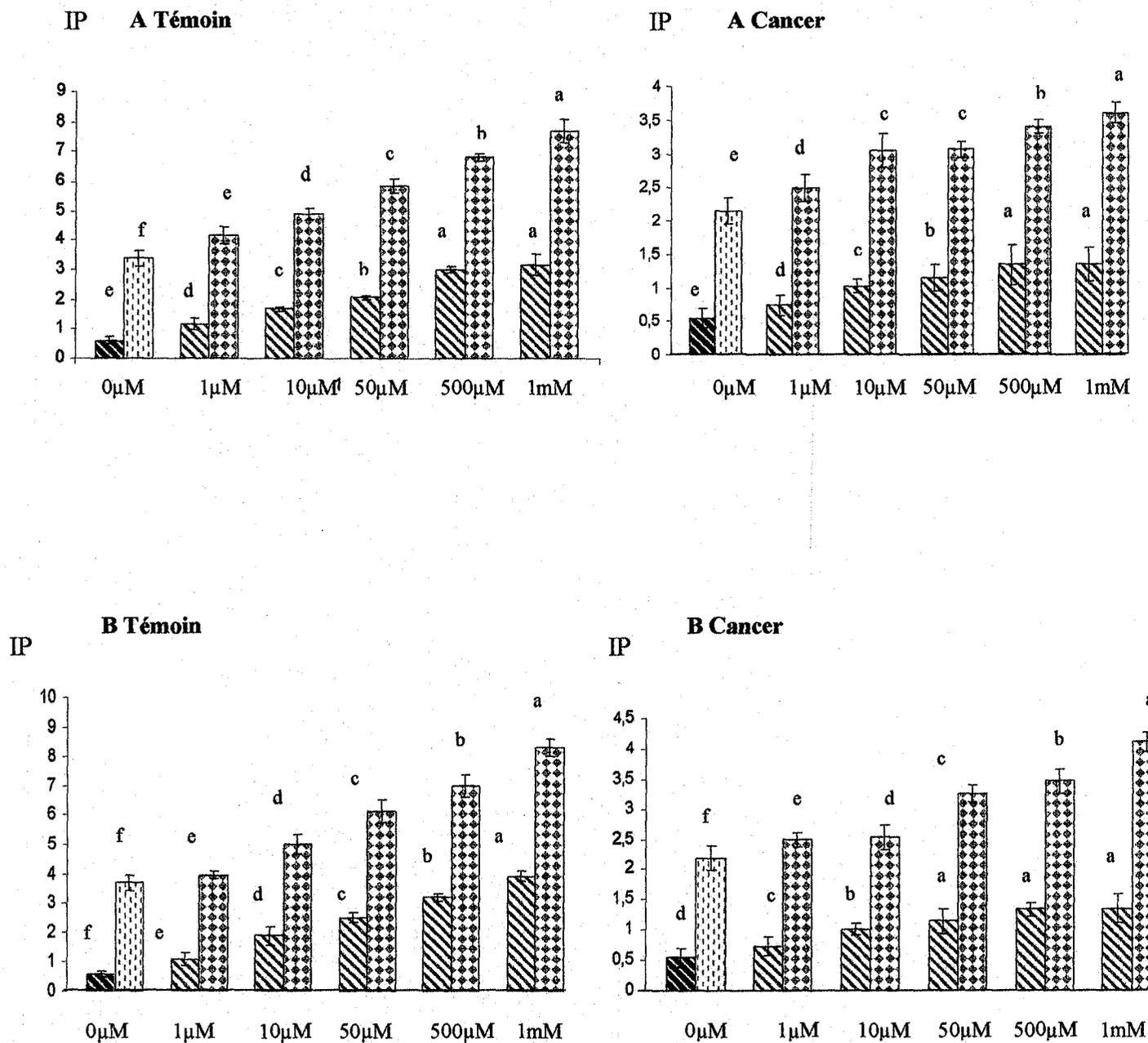


Figure 11 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 2 sur l'indice de prolifération des lymphocytes stimulés par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. L'indice de prolifération correspond au rapport de la densité optique des cellules stimulées sur la densité optique des cellules non stimulées. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).



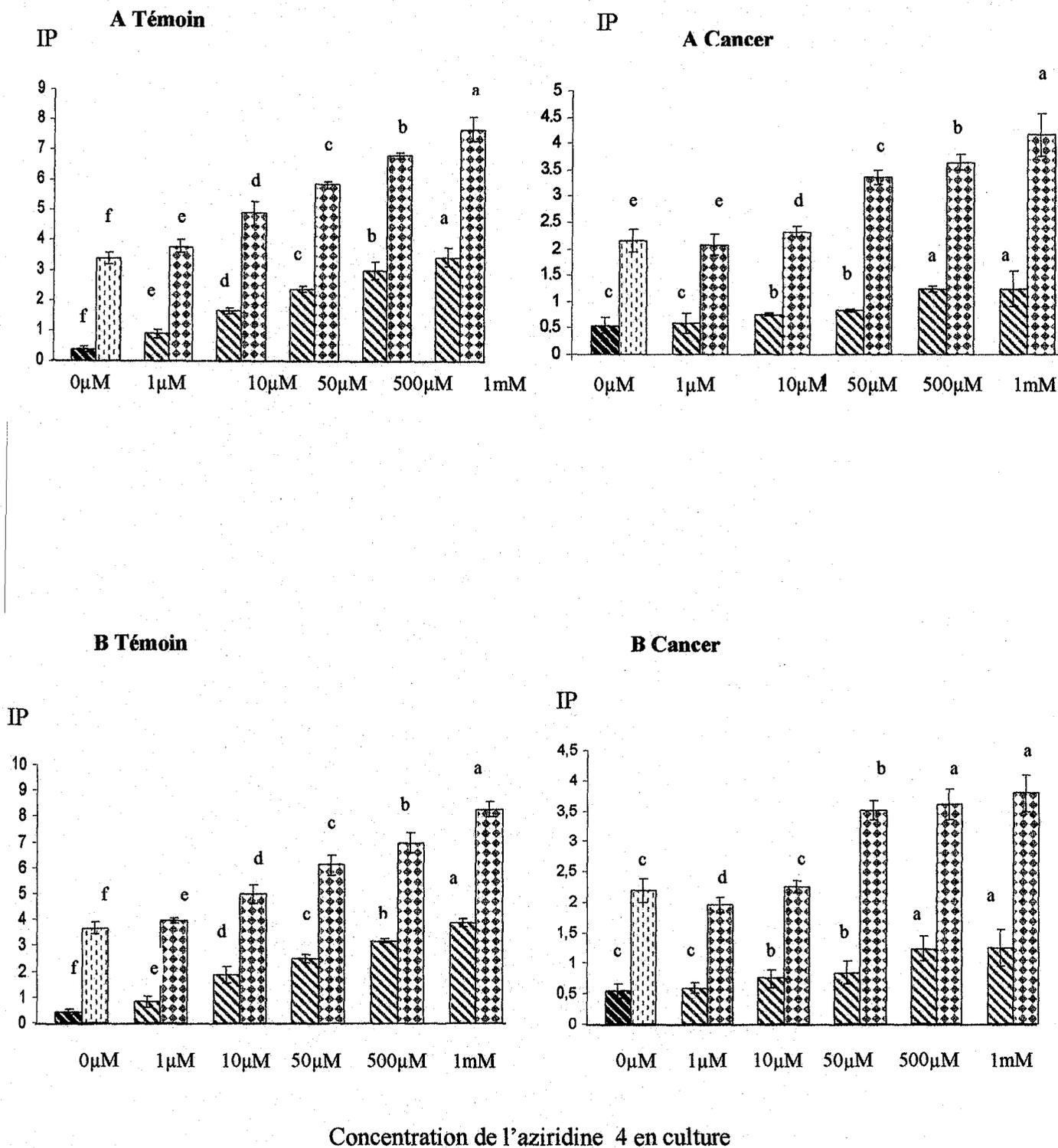
Concentration de l'aziridine 3 en culture

Témoin sans mitogène
 Témoin avec ConA (A) ou LPS (B)
 Aziridines
 Aziridine + Con A (A) ou LPS (B)

Figure 12 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 3 sur l'indice de prolifération des lymphocytes stimulés par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. L'indice de prolifération correspond au rapport de la densité optique des cellules stimulées sur la densité optique des cellules non stimulées. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).



■ Témoin sans mitogène ▨ Témoin avec ConA (A) ou LPS (B) ▤ Aziridines ▩ Aziridine + Con A (A) ou LPS (B)

Figure 13 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 4 sur l'indice de prolifération des lymphocytes stimulés par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. L'indice de prolifération correspond au rapport de la densité optique des cellules stimulées sur la densité optique des cellules non stimulées. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).

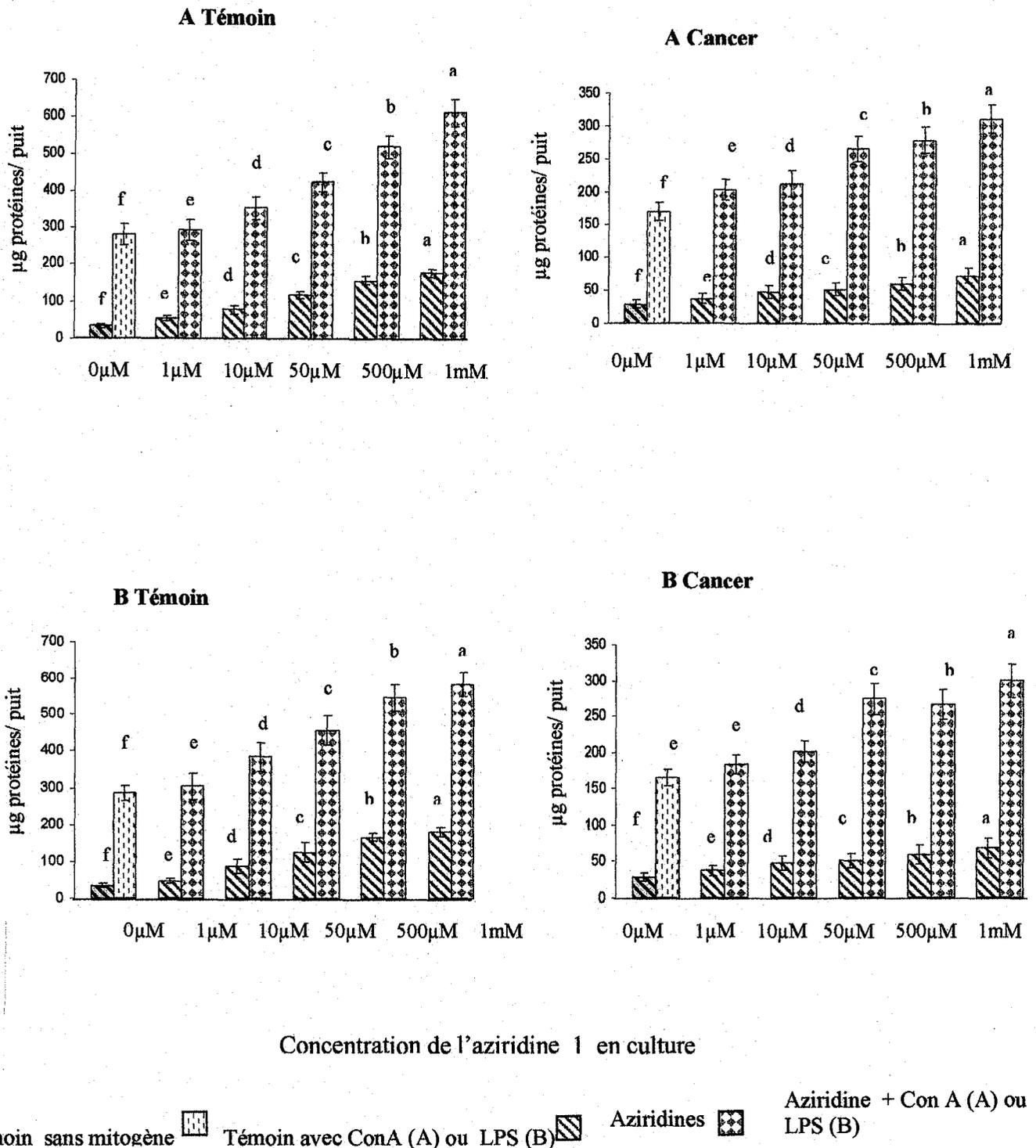
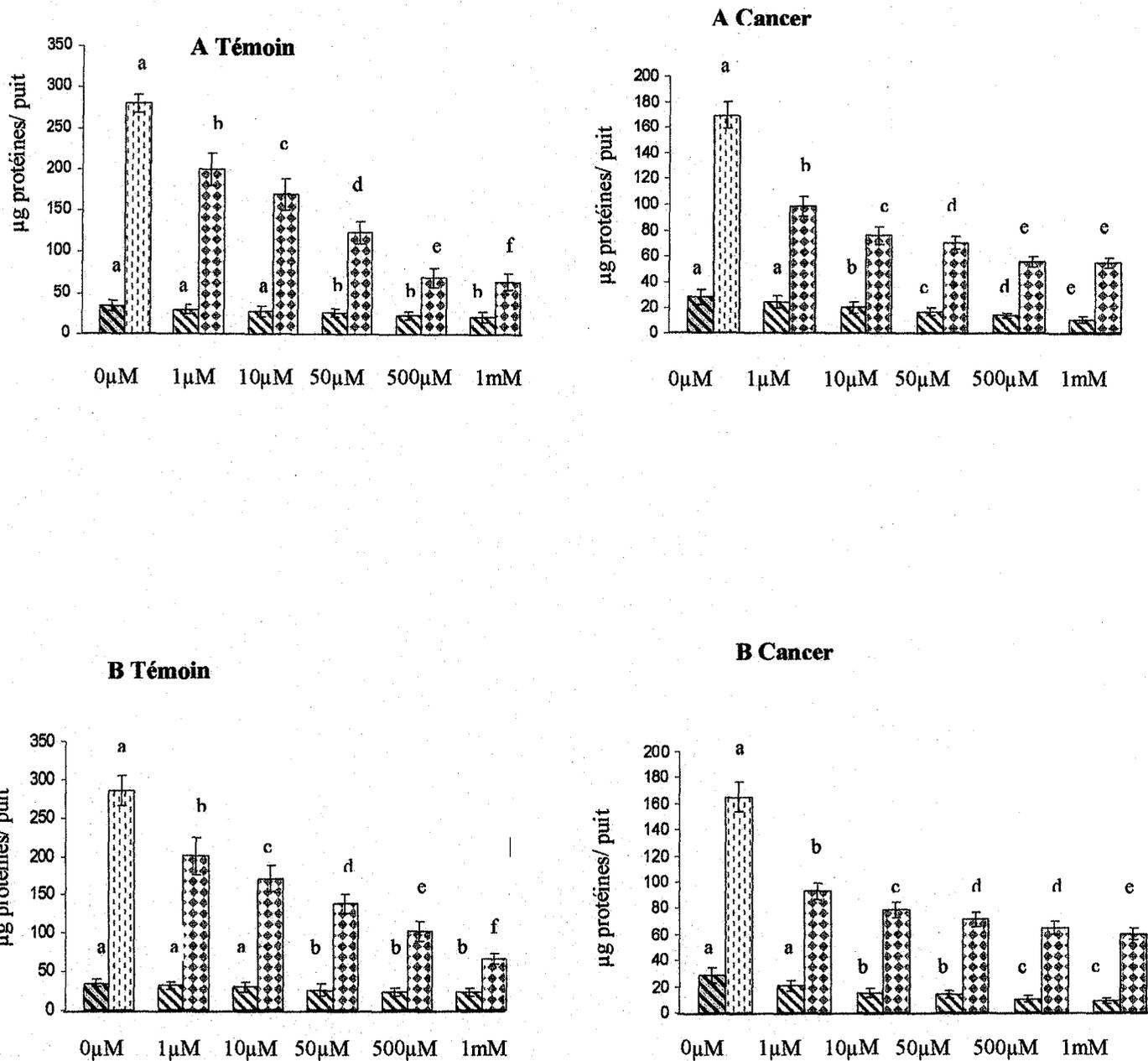


Figure 14 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 1 sur le contenu protéique des lymphocytes stimulés par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P < 0,05).



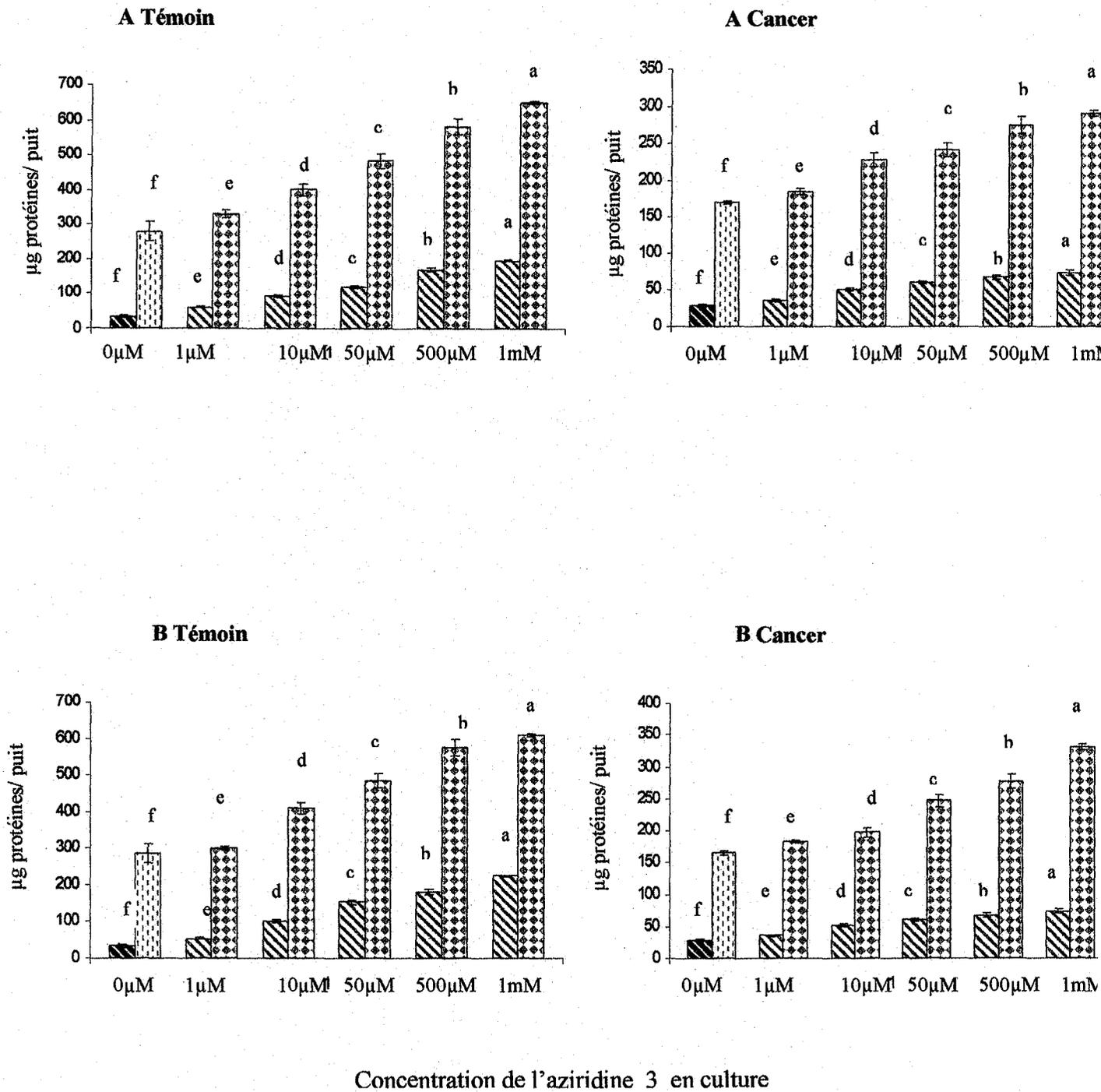
Concentration de l'aziridine 2 en culture

Témoin sans mitogène
 Témoin avec ConA (A) ou LPS (B)
 Aziridines
 Aziridine + Con A (A) ou LPS (B)

Figure 15 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 2 sur le contenu protéique des lymphocytes stimulés par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).



Concentration de l'aziridine 3 en culture

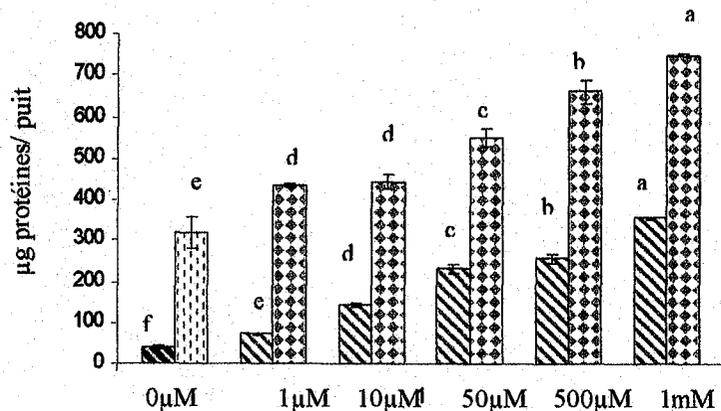
Témoin sans mitogène
 Témoin avec ConA (A) ou LPS (B)
 Aziridines
 Aziridine + Con A (A) ou LPS (B)

Figure 16 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 3 sur le contenu protéique des lymphocytes stimulés par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

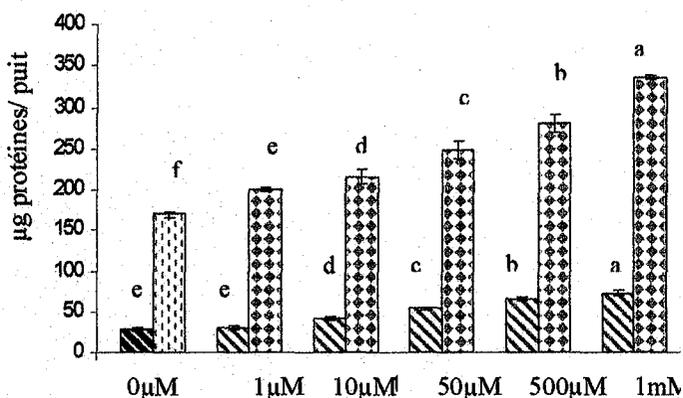
Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).

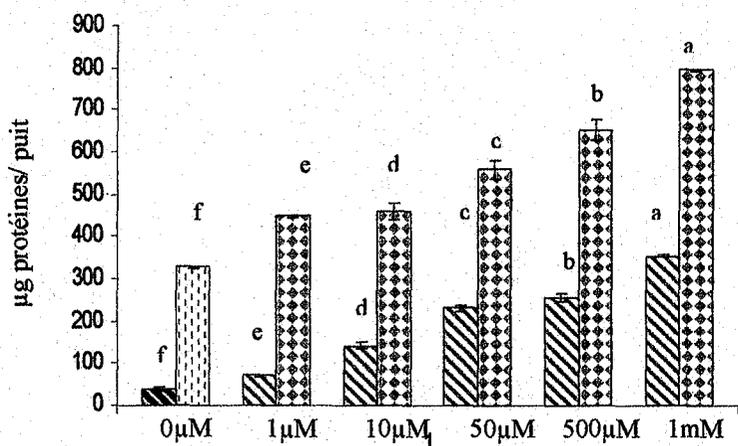
A Témoin



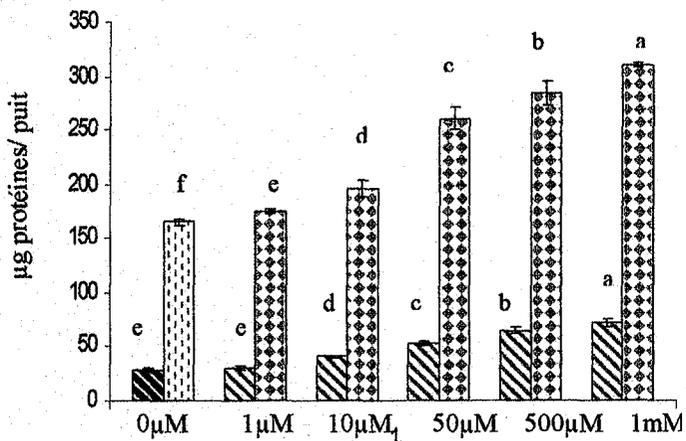
A Cancer



B Témoin



B Cancer



Concentration de l'aziridine 4 en culture

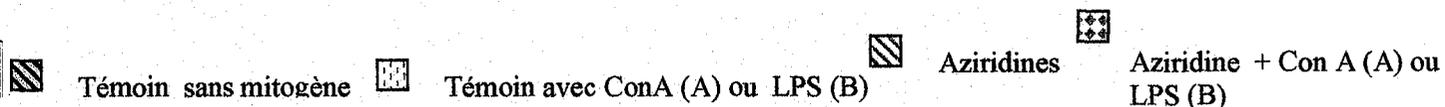
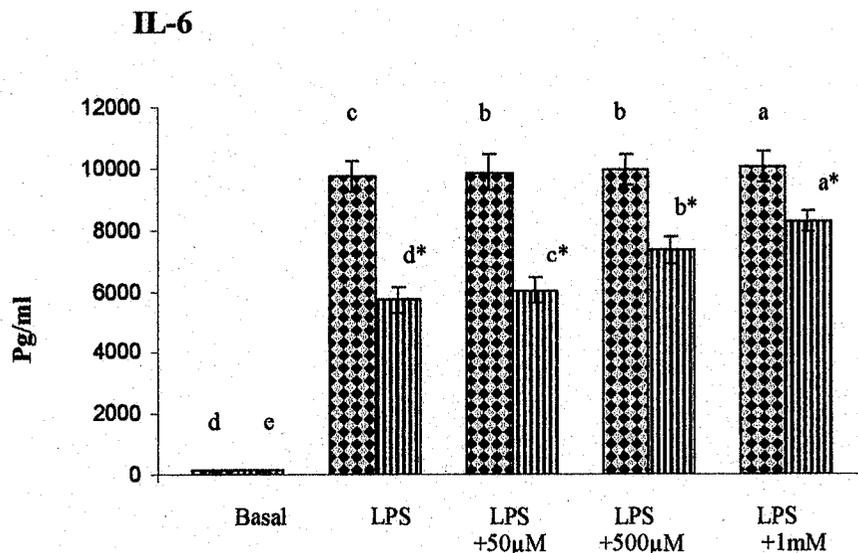
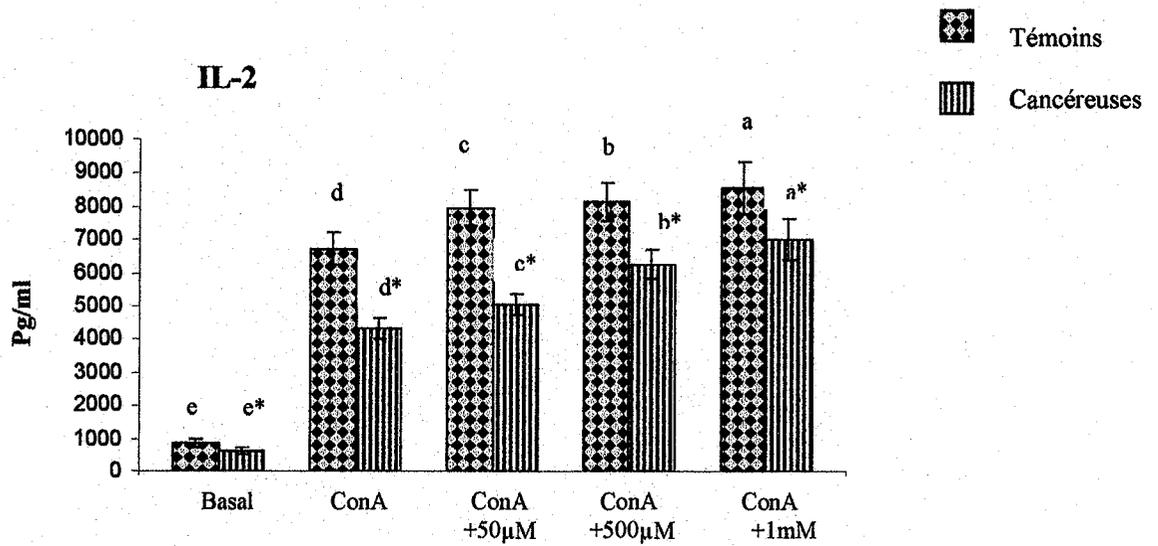


Figure 17 : Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine 4 sur le contenu protéique des lymphocytes stimulés par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B) chez les témoins et les femmes présentant un cancer du sein.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

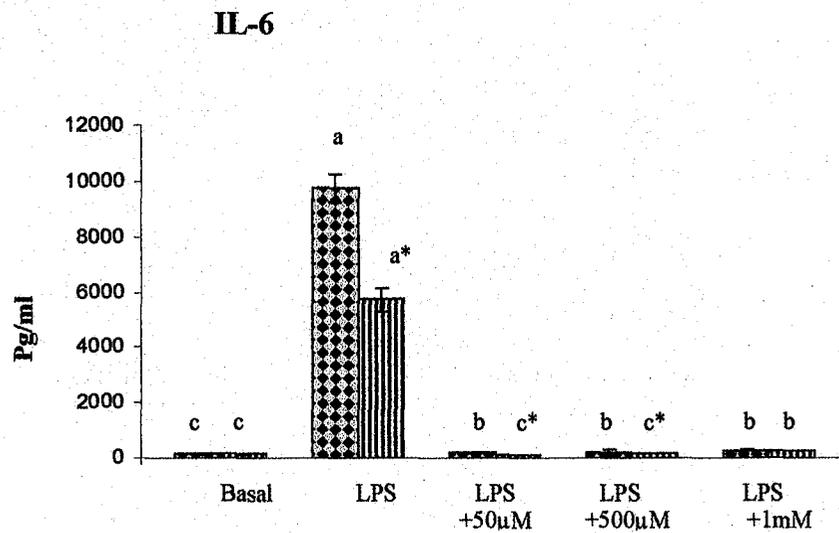
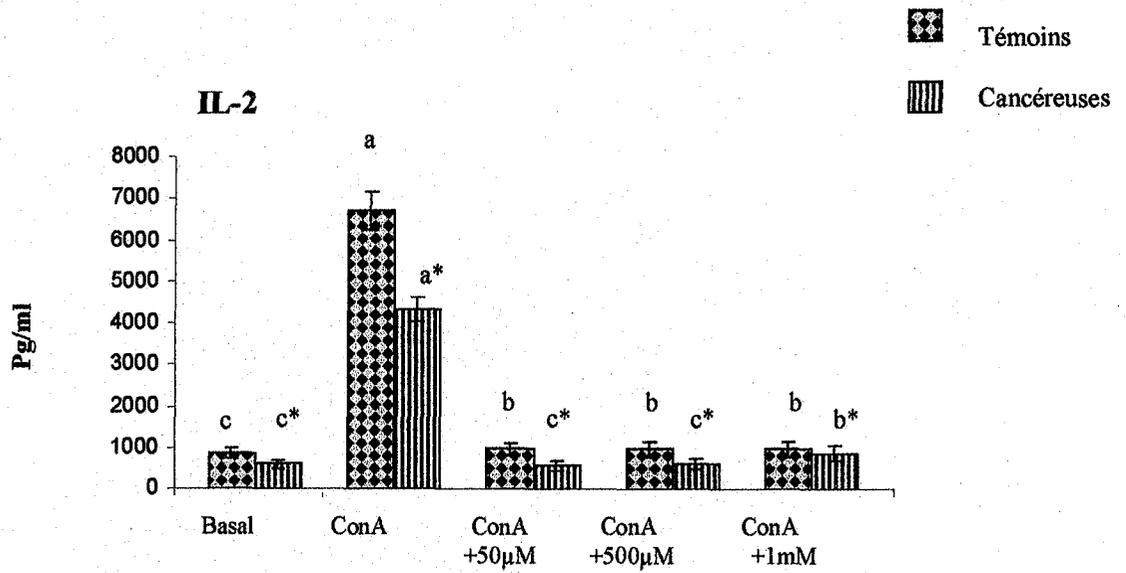
a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).



Concentration de l'aziridine 1 en culture

Figure 18 : Production d'interleukine 2 (IL-2) et d'interleukine 6 (IL-6) par les lymphocytes T et B activés et incubés en présence de l'aziridine 1 chez les femmes témoins et chez les femmes cancéreuses.

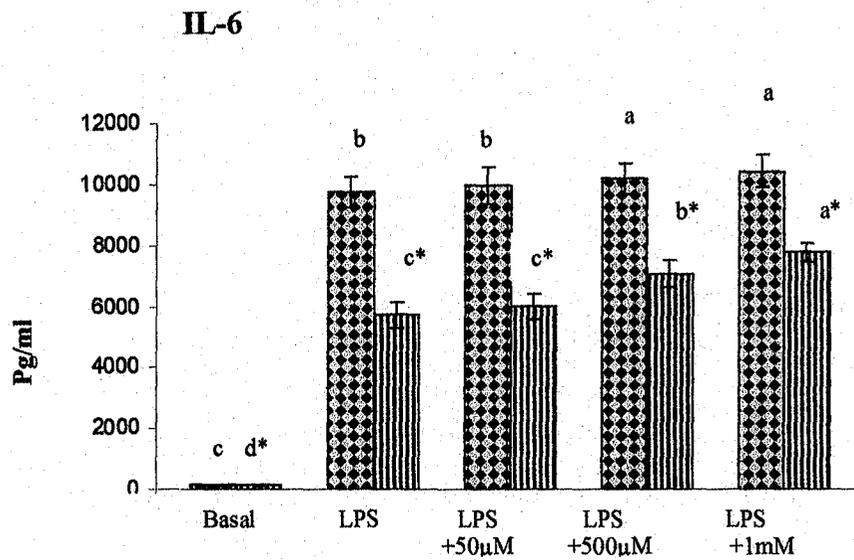
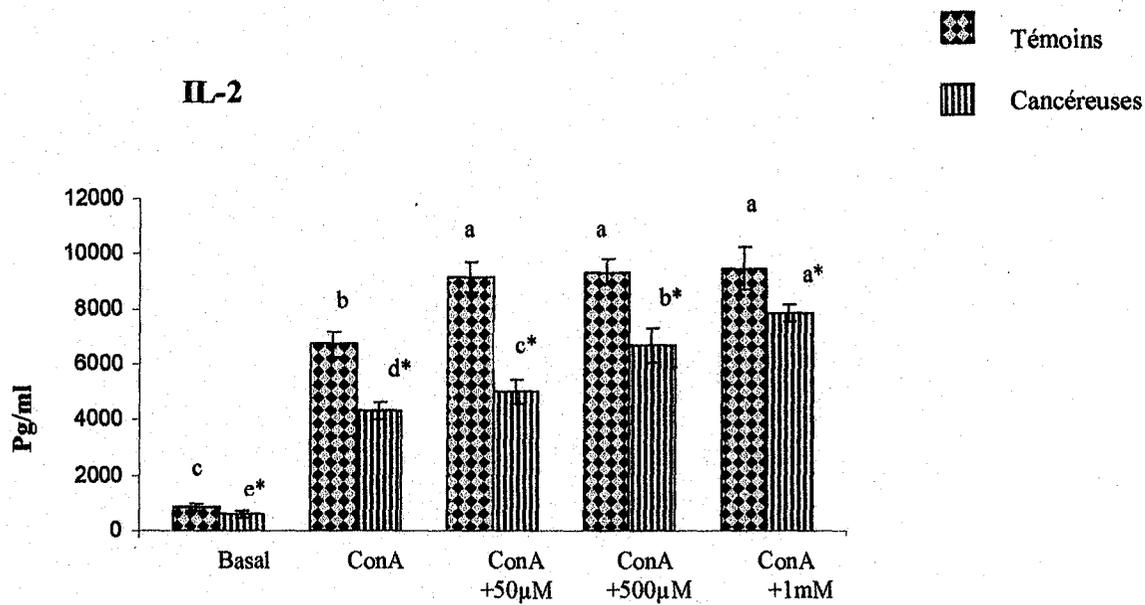
Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes Témoins et 10 femmes cancéreuses. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0.05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les cancéreuses ($p < 0.05$). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.



Concentration de l'aziridine 2 en culture

Figure 19 : Production d'interleukine 2 (IL-2) et d'interleukine 6 (IL-6) par les lymphocytes T et B activés et incubés en présence de l'aziridine 2 chez les femmes témoins et chez les femmes cancéreuses.

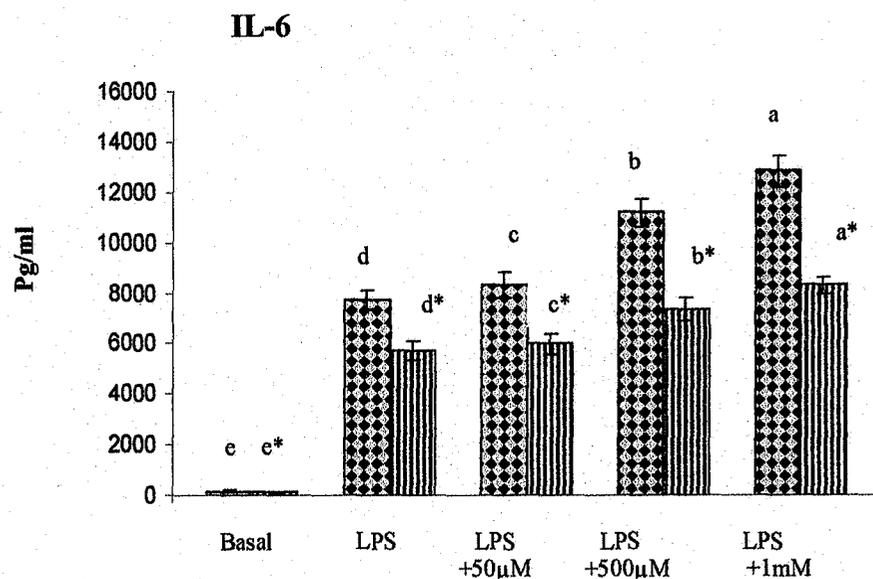
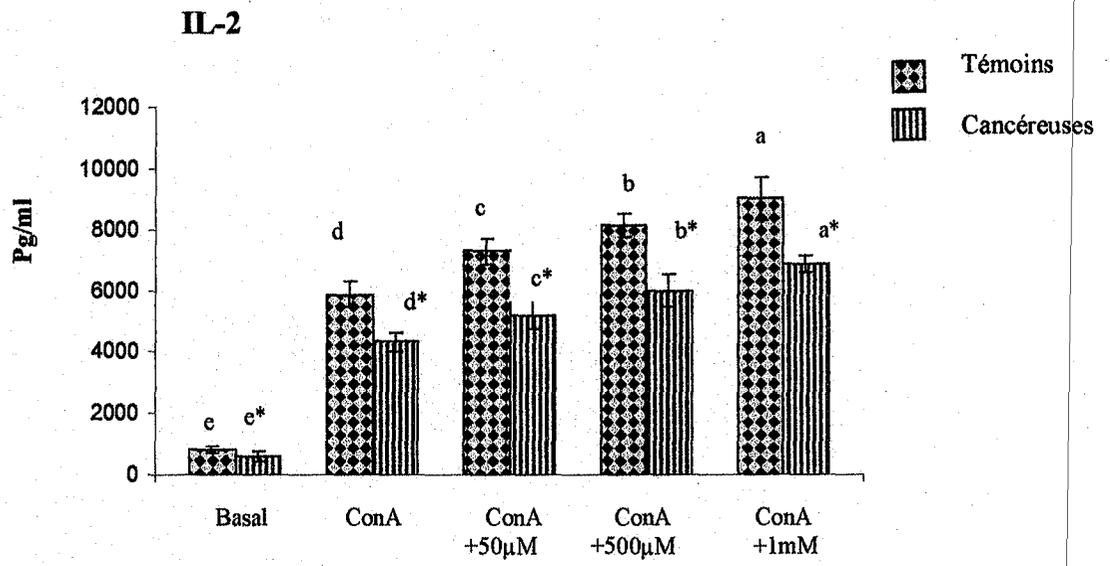
Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes Témoin et 10 femmes cancéreuses. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0.05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les cancéreuses ($p < 0.05$). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.



Concentration de l'aziridine 3 en culture

Figure 20: Production d'interleukine 2 (IL-2) et d'interleukine 6 (IL-6) par les lymphocytes T et B activés et incubés en présence de l'aziridine 3 chez les femmes témoins et chez les femmes cancéreuses.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes Témoins et 10 femmes cancéreuses. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0.05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les cancéreuses ($p < 0.05$). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.



Concentration de l'aziridine 4 en culture

Figure 21 : Production d'interleukine 2 (IL-2) et d'interleukine 6 (IL-6) par les lymphocytes T et B activés et incubés en présence de l'aziridine 4 chez les femmes témoins et chez les femmes cancéreuses.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes Témoins et 10 femmes cancéreuses. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0.05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les cancéreuses ($p < 0.05$). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

I.4. Composition en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes (pourcentage pondéraux)

L'immunothérapie a pour objectif la recherche d'un effet immunostimulateur dans le cas du cancer. Ainsi parmi les 4 aziridines testées, nous avons choisi l'aziridine 3, dont l'effet immunostimulateur est le plus important, pour poursuivre nos recherches sur les mécanismes d'action des aziridines et notamment sur la modification de la composition en acides gras des phospholipides (PL) des membranes des lymphocytes.

Etant donné que l'effet immunostimulateur de l'aziridine 3 ($R = \text{PhCH}_2$) est mieux marqué à une concentration de 1mM, seule cette concentration est utilisée pour déterminer la composition en acide gras membranaires des lymphocytes T stimulés ou non.

L'analyse de la composition en acide gras des phospholipides membranaires lymphocytaires montre en présence de la ConA, une réduction des pourcentages des AGS chez les témoins volontaires et chez les femmes cancéreuses par rapport à la composition basale (**figure 22**). Chez les deux populations, les pourcentages d'AGMI augmentent ($p < 0.05$) correspondant à l'augmentation du C18 :1. Le rapport P/S diminue ($p < 0.05$), accompagnée d'une diminution du C20 :4n-6, du C20 :5n-3 et du C22 :6n-3 chez les témoins, en présence de la ConA par rapport à la composition basale. Chez les femmes cancéreuses, les mêmes modifications sont observées (**figure 22 et Tableau A17 en Annexe**).

En présence de l'aziridine 3 à 1 mM dans le milieu d'incubation, les pourcentages des AGS, et des AGPI, ainsi que le rapport P/S restent plus ou moins stable par rapport à la composition basale ou avec ConA seule chez les deux populations étudiées. Alors que les pourcentages des AGMI restent stables chez les témoins,

l'aziridine diminue ces valeurs chez les femmes cancéreuses, au niveau des lymphocytes stimulés par la ConA (**figure 22, Tableau A17**).

1.5. Caractère alkylant des aziridines (figures 23, 24)

Afin de vérifier que les quatre nouvelles aziridines synthétisées dans notre laboratoire sont des substances alkylantes à l'ADN, une électrophorèse sur gel d'agarose avec révélation de l'ADN par l'acridine orange ou le bleu de Nile, est réalisée. L'ADN est une molécule chargée négativement qui soumise à un champ électrique diffuse au sein d'un hydrogel d'agarose. Après complexation d'aziridine avec l'ADN, la charge de l'ADN devient positive, de ce fait l'ADN montre un retard de migration dans sa mobilité électrophorétique par rapport aux cellules incubées en absence d'aziridines (**figure 23**)

Le test des comètes (aussi appelé Single Cell Gel Electrophoresis Assay), également appelée électrophorèse en gel des cellules isolées, est extrêmement sensible pour analyser les dommages de l'ADN, induits par certains agents dans des lymphocytes humains en culture. Les cellules sont incluses dans un gel d'agarose et déposées sur une lame de microscope. Après lyse des membranes cellulaires, l'ADN est dénaturé en milieu alcalin et une courte électrophorèse permet la migration des fragments lésés donnant ainsi un aspect de "comètes" aux cellules.

En effet en absence d'aziridine, le noyau de la cellule d'ADN reste intact sous forme d'une sphère, il ne migre pas (**figure 24**). En présence de l'aziridine, le noyau est endommagé formant une queue de comète traduisant une toxicité vis-à-vis de l'ADN.

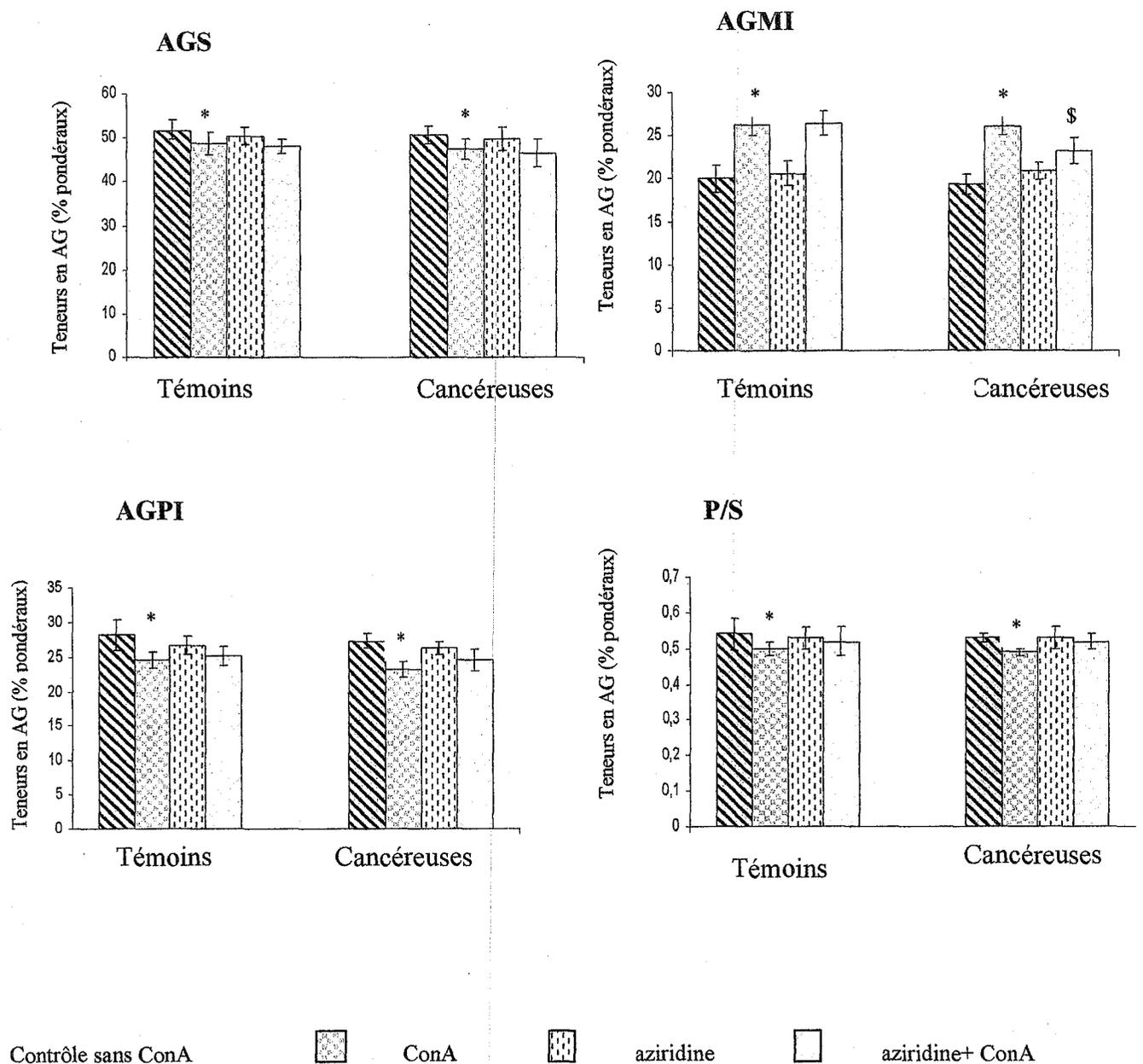
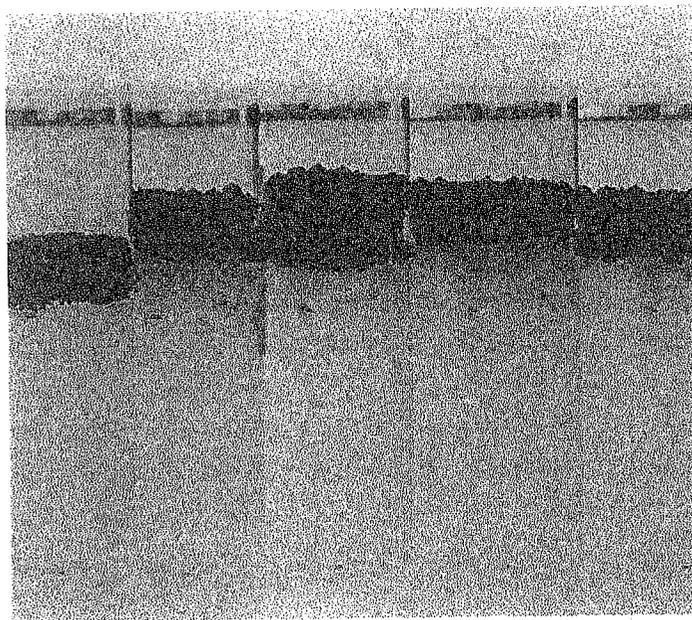


Figure 23 : Composition en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T en présence de l'aziridine 3 à 1mM (en % pondéraux des AG totaux).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes témoins et 10 femmes cancéreuses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

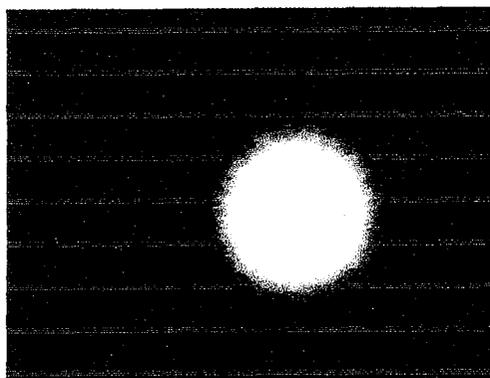
- ConA ou aziridine comparé à sans ConA : * $P < 0,05$.
- Aziridine + ConA comparé à ConA : \$ $P < 0,05$.



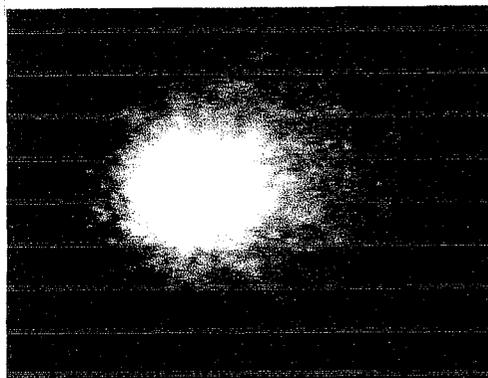
1 2 3 4 5

- 1 : ADN seul
- 2 : ADN avec aziridine 1
- 3 : ADN avec aziridine 2
- 4 : ADN avec aziridine 3
- 5 : ADN avec aziridine 4

Figure 24 : électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN coloré par le bleu de Nile en présence des aziridines.

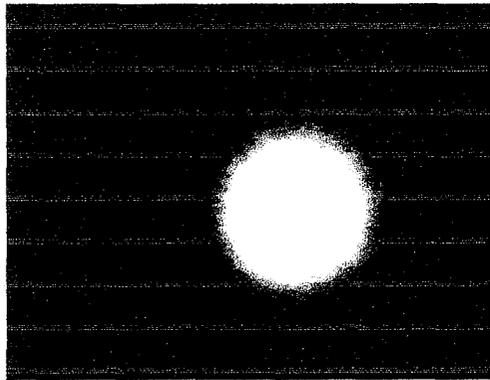


(Lymphocytes incubés sans aziridine)

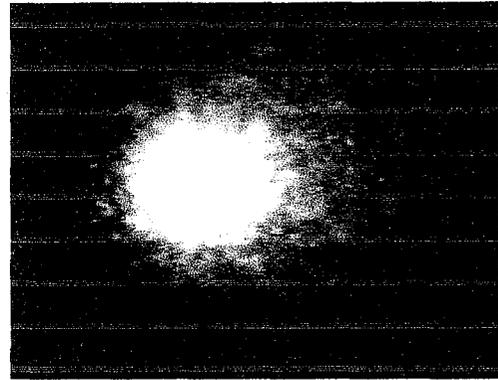


(Lymphocytes incubés en présence d'aziridine)

Figure 25 : Mise en évidence des cassures au sein de l'ADN des lymphocytes humains provoqués par les aziridines de synthèses par le test de comètes (électrophorèse sur gel d'agarose, coloration à l'acridine orange, observation des gels sous lumière UV à l'aide d'une caméra, Laboratoire ADN- INMED, France).



(Lymphocytes incubés sans aziridine)



(Lymphocytes incubés en présence d'aziridine)

Figure 25 : Mise en évidence des cassures au sein de l'ADN des lymphocytes humains provoqués par les aziridines de synthèses par le test de comètes (électrophorèse sur gel d'agarose, coloration à l'acridine orange, observation des gels sous lumière UV à l'aide d'une caméra, Laboratoire ADN- INMED, France).

II. Effets in vivo des aziridines de synthèse chez le rat wistar : Essais de toxicité aigue

II.1. Détermination de la dose létale 50 : DL₅₀ (Figures 26-29, Tableaux 5-8)

Après injection intrapéritonéale d'aziridine à différentes doses, les rats sont observés pendant 14 jours.

Le taux de mortalité est noté pour chaque dose utilisée. Une courbe dose-létalité, représentant les pourcentages de mortalité par rapport aux logarithmes des doses, est tracée pour chaque aziridine testée. Cette courbe permet de déterminer la DL₅₀ de chaque substance chimique et de la comparer aux valeurs données dans l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1949).

Nos résultats montrent que la DL₅₀ de l'aziridine 1 est de 65 mg/kg (**Tableau 5, figure 26**) puisqu'elle provoque la mort de 50 % des rats (3 rats sur 6). L'aziridine 2 montre une DL₅₀ de 68.50 mg/kg (**Tableau 6, figure 27**).

Concernant l'aziridine 3, la valeur de la DL₅₀ est obtenue sur le tracé de la courbe. Elle est comprise entre 87.5 mg/kg (dose provoquant 33.33 % de mortalité) et 131.25 mg/kg (dose provoquant 66.67 % de mortalité), (**Tableau 7, figure 28**). La DL₅₀ de l'aziridine 3 est donc estimée à 100 mg/kg.

De la même façon, pour l'aziridine 4, la DL₅₀ est comprise entre 93.5 mg/kg (dose provoquant 33.33 % de mortalité) et 140.25 mg/kg (dose provoquant 66.67 % de mortalité), (**Tableau 8, figure 29**). La DL₅₀ de l'aziridine 4 est donc estimée à 104.71 mg/kg. Les quatre aziridines utilisées sont classées comme moyennement toxiques selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner.

II.2. Manifestation de la toxicité aiguë

L'observation clinique est réalisée chaque jour, le matin à la même heure.

L'administration de l'aziridine a provoqué chez les rats différents signes cliniques dont la sévérité et l'intensité augmentent avec la dose injectée, et ceci quelque soit l'aziridine testée. Les symptômes de toxicité sont apparus 24 heures après l'injection de l'aziridine. Les principaux signes observés sont résumés dans le **Tableau 9**.

Nos résultats montrent que l'importance d'un signe clinique est d'autant plus grande que le bien-être de l'animal est compromis.

Quelque soit l'aziridine testée, l'injection de la dose 2 (26 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 35 mg/kg pour l'aziridine 3 et 37.4 mg/kg pour l'aziridine 4) constitue le point à partir duquel les états physiologiques et mentaux de l'animal sont déviants de la normale. A partir de cette dose, les perturbations de l'apparence physique, du pelage, de la respiration, des sécrétions, du comportement et de la température deviennent de plus en plus importantes et dénotent une toxicité évidente.

A la dose 5 (130 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 137 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 175 mg/kg pour l'aziridine 3 et 187 mg/kg pour l'aziridine 4), tous les animaux sont moribonds, ce qui constitue le point limite dans les tests toxicologiques.

II.3. Variation du poids corporel et de la croissance relative des rats

Au cours de la période d'expérimentation (14 jours), le poids des rats est noté quotidiennement le matin à la même heure. Les variations du poids corporel sont déterminées chez les rats témoins (recevant une injection d'eau physiologique) et chez les rats expérimentaux (recevant une injection d'aziridine testée). Seules les valeurs à J_0 (au moment des injections), J_7 (fin de la première semaine) et J_{14} (fin de la période

d'observation) sont reportés dans les **Tableaux A 18- A 21 (en Annexe)** et **figures 29-32**.

Au début de l'expérimentation (J0), les différents lots de rats ont des poids homogènes, variant de 196 à 210 g. Quelque soit l'aziridine testée, l'injection de la première dose (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4) ne provoque pas de variations significatives du poids corporel des rats expérimentaux comparés aux témoins aux différents temps (J₇ et J₁₄). Par contre, l'injection des autres doses supérieures à la dose 1 est associée à une diminution du poids corporel des rats expérimentaux comparés à leurs témoins à J₇ et J₁₄. Cette réduction est plus importante à J₁₄, quelque soit l'aziridine testée (**figures 29-32**).

La croissance relative des rats représente le gain pondéral moyen par rapport au poids initial pendant la période d'observation, et donc reflète mieux les variations du poids corporel au cours du temps. La croissance relative est calculée pour les rats des différents lots. Les valeurs sont positives en cas de croissance normale avec un gain de poids et négatives en cas de perte de poids (**Tableau A 22 en Annexe et figure 33**).

Les rats témoins montrent une croissance normale avec un gain moyen quotidien de 30 % durant la première semaine et de 23 % durant la deuxième semaine d'observation. La croissance des rats n'est pas affectée par l'injection de la dose 1 d'aziridine. Par contre, les capacités de croissance sont fortement diminuées suite à l'injection des doses 2, 3 et 4 d'aziridine puisque les rats expérimentaux ont présenté une croissance moindre que leurs témoins avec même perte de poids aux doses élevées, et ceci quelque soit l'aziridine testée. La perte de poids est d'autant plus importante que la dose augmente.

Tableau 9 : signes cliniques observés après administration de l'aziridine à différentes doses.

Dose d'aziridine	Signes cliniques
<p><u>Dose 1</u></p> <p>Aziridine 1 : 6.5 mg/Kg Aziridine 2 : 6.85 mg/Kg Aziridine 3 : 8.75 mg/Kg Aziridine 4 : 9.35 mg/Kg</p>	<p>Apparence physique: normale. Pelage: lisse, toilettage normal. Posture: normale. Yeux: légèrement rouge. Salivation: normale. Respiration: légère dyspnée. Comportement : changement mineur avec légère agitation. Urine et fèces: normales. Température rectale: 38° C.</p>
<p><u>Dose 2</u></p> <p>Aziridine 1: 26 mg/Kg Aziridine 2: 27.4 mg/Kg Aziridine 3: 35 mg/Kg Aziridine 4: 37.4 mg/Kg</p>	<p>Apparence physique: posture anormale avec dos arrondi. Pelage: manque de toilettage, souillure urinaire. Yeux: larmoiement et écoulement. Salivation: normale. Respiration: légère dyspnée. Comportement : agitation, manque de coordination des mouvements, parcours circulaires répétitifs. Urine et fèces: légère diarrhée. Température rectale: 37.5° C. Mortalité: mort de 1 ou 2 rats, selon l'aziridine testée, 8 jours après l'injection.</p>
<p><u>Dose 3</u></p> <p>Aziridine 1: 65 mg/Kg Aziridine 2: 68.5 mg/Kg Aziridine 3: 87.5 mg/Kg Aziridine 4: 93.5 mg/Kg</p>	<p>Apparence physique: anormale, posture anormale. Pelage: poil ébouriffé, souillure urinaire, absence de toilettage. Yeux: couleur pâle des yeux, écoulement oculaire et nasal. Salivation: excessive. Respiration: dyspnée anormale. Comportement : agressivité, tendance à mordre, tremblements. Urine et fèces: polyurie, diarrhée. Température rectale: 37° C. Mortalité: mort de 2 ou 3 rats, selon l'aziridine testée, 6 jours après l'injection.</p>

<p><u>Dose 4</u></p> <p>Aziridine 1: 97.5 mg/Kg</p> <p>Aziridine 2: 102.75 mg/Kg</p> <p>Aziridine 3: 131.25mg/Kg</p> <p>Aziridine 4: 140.25mg/Kg</p>	<p>Apparence physique: posture anormale, animal amaigri.</p> <p>Pelage: poil très ébouriffé, chute de poils, absence de toilettage.</p> <p>Yeux: anémie, écoulement.</p> <p>Hypersalivation.</p> <p>Respiration: Dyspnée ou Tachypnée.</p> <p>Comportement : mobilité réduite, hypoactivité, tremblements irréguliers.</p> <p>Urine et fèces: présence de sang dans les urines et les fèces, coloration marquée des fèces, diarrhée.</p> <p>Température rectale: 36.7° C.</p> <p>Mortalité: mort de 4 à 6 rats, selon l'aziridine testée, 4 jours après l'injection</p>
<p><u>Dose 5</u></p> <p>Aziridine 1: 130 mg/Kg</p> <p>Aziridine 2: 137 mg/Kg</p> <p>Aziridine 3: 175 mg/Kg</p> <p>Aziridine 4: 187 mg/Kg</p>	<p>Apparence physique: posture anormale, animal amaigri.</p> <p>Pelage: poil très ébouriffé, cyanose, chute de poils.</p> <p>Yeux: anémie, écoulement.</p> <p>Hypersalivation.</p> <p>Respiration: Tachypnée.</p> <p>Comportement : mobilité réduite, hypoactivité, tremblements irréguliers.</p> <p>Urine et fèces: présence de sang dans les urines et les fèces, coloration marquée des fèces, diarrhée.</p> <p>Température rectale: 36° C.</p> <p>Mortalité: mort de 6 rats, quelque soit l'aziridine testée, 24 heures à 72 heures après l'injection.</p>

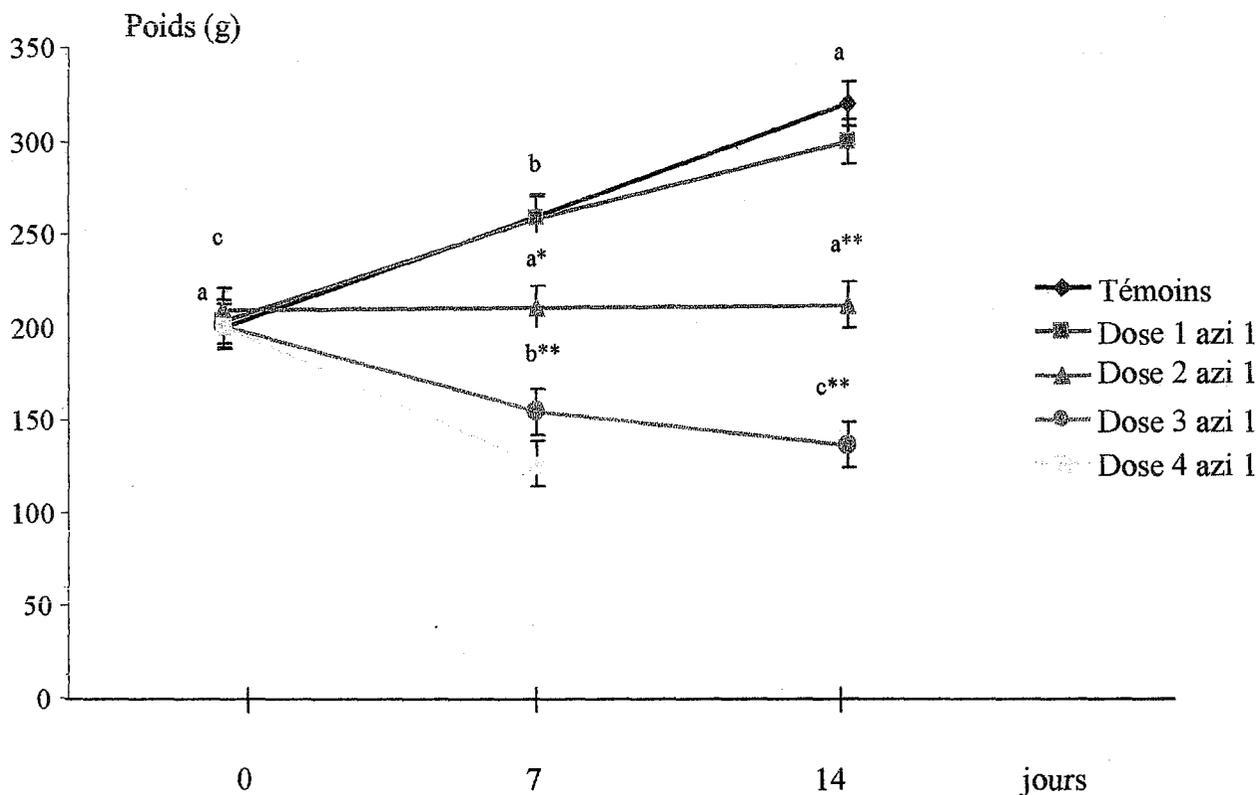


Figure30: Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine1) durant les 14 jours d'observation

J₀: poids initial ; J₇: poids après une semaine ; J₁₄: poids après 2 semaines.

Dose 1: 6.5 mg/kg; **dose 2:** 26 mg/kg; **dose 3:** 65 mg/kg; **dose 4:** 97.5mg/kg; **dose 5:** 130 mg/kg

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de variance. * P<0.05 ; ** P <0.01

Dans chaque lot, la classification des moyennes, en fonction du temps, est effectuée par le test rang multiple de Duncan, après analyse de variance. Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (P<0.05).

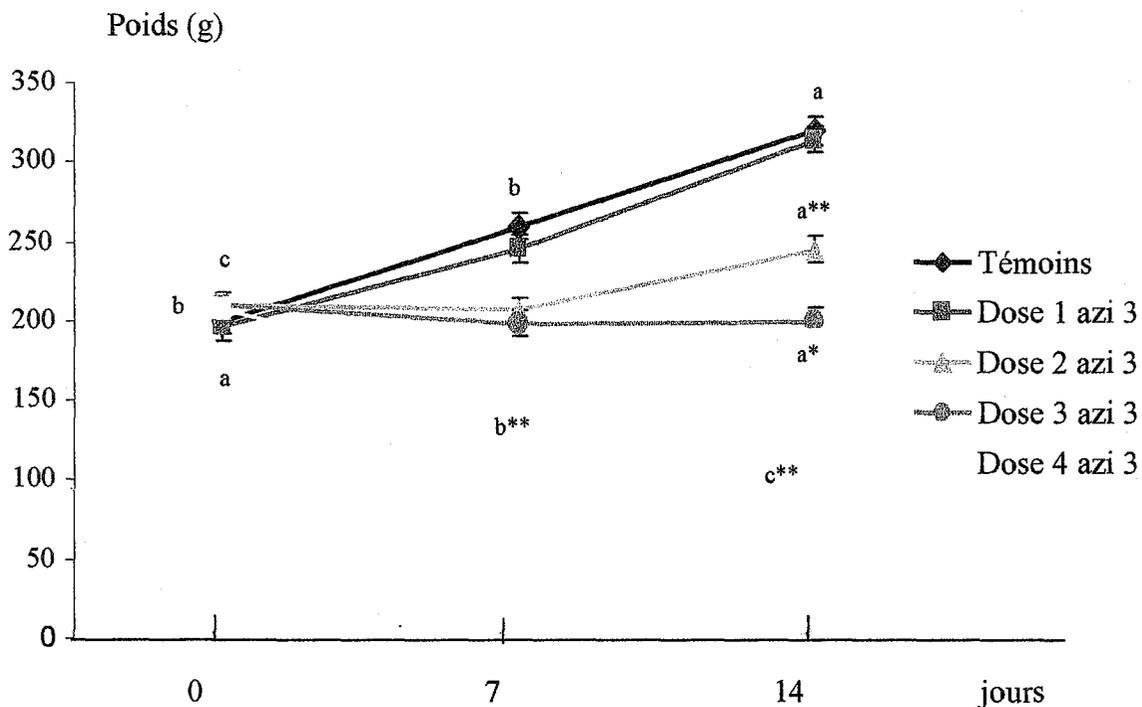


Figure 32: Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 3) durant les 14 jours d'observation

J₀: poids initial ; J₇: poids après une semaine ; J₁₄: poids après 2 semaines.

Dose 1: 8.75 mg/kg; **dose 2:** 35 mg/kg; **dose 3:** 87.5mg/kg; **dose 4:** 131.25mg/kg; **dose 5:** 175 mg/kg

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de variance. * P<0.05 ; ** P <0.01

Dans chaque lot, la classification des moyennes, en fonction du temps, est effectuée par le test rang multiple de Duncan, après analyse de variance. Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (P<0.05).

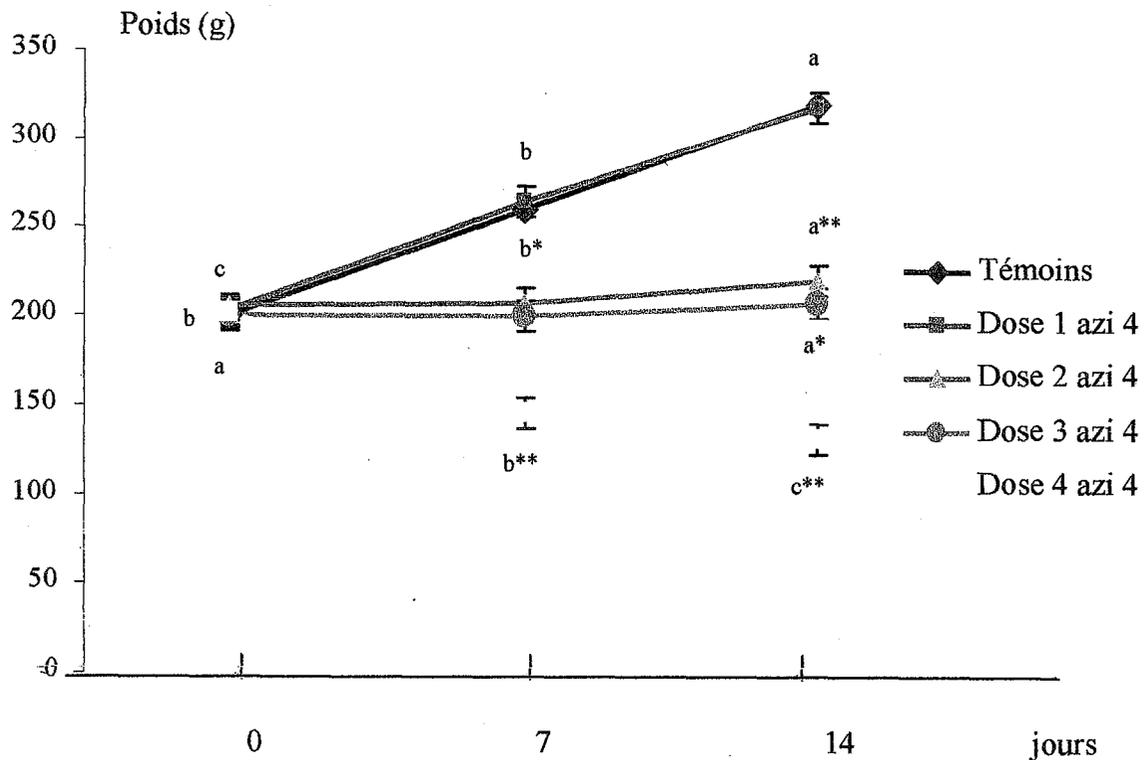


Figure 33: Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 4) durant les 14 jours d'observation

J₀: poids initial ; J₇: poids après une semaine ; J₁₄: poids après 2 semaines.

Dose 1: 9.35 mg/kg; **dose 2:** 37.5 mg/kg; **dose 3:** 93.5 mg/kg; **dose 4:** 140.25mg/kg; **dose 5:** 187 mg/kg

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. La comparaison de ^a moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de variance. * P<0.05 ; ** P <0.01

Dans chaque lot, la classification des moyennes, en fonction du temps, est effectuée par le test rang multiple de Duncan, après analyse de variance. Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (P<0.05).

II.4. Variation des ingestions et des excréctions

II.4.1. Variation de l'ingestion d'aliments et d'eau

Au cours de la période d'expérimentation (14 jours), les variations de l'ingestion d'aliments (g/j/rat) et d'eau (ml/j/rat) sont notées quotidiennement le matin à la même heure, chez les rats témoins (recevant une injection d'eau physiologique) et chez les rats expérimentaux (recevant une injection d'aziridine testée) (**Tableaux A 23, A 24 en Annexe et figures 34,35**).

Quelque soit l'aziridine testée, l'injection de la première dose (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4) ne provoque pas de variations significatives de l'ingestion d'aliments et d'eau des rats expérimentaux comparés aux témoins durant la première semaine et la deuxième semaine d'observation. Par contre, la consommation alimentaire exprimée en g/j/rat et l'ingestion d'eau exprimée en ml/j/rat sont fortement diminuées suite à l'injection des doses 2, 3 et 4 d'aziridine. Cette réduction est plus importante à la dose 4, quelque soit l'aziridine testée (**figures 34,35**).

II.4.2. Variation de l'excrétion de fèces et d'urine

Au cours de la période d'expérimentation (14 jours), Les urines et les fèces sont collectées durant des périodes de 7 jours, au cours de la première semaine et la deuxième semaine d'observation.

Chez les rats témoins (recevant une injection d'eau physiologique) et chez les rats expérimentaux (recevant une injection d'aziridine testée), l'injection de la première dose (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4) ne provoque pas de variations significatives de l'excrétion fécale exprimée en (g/j/rat) et urinaire exprimée en

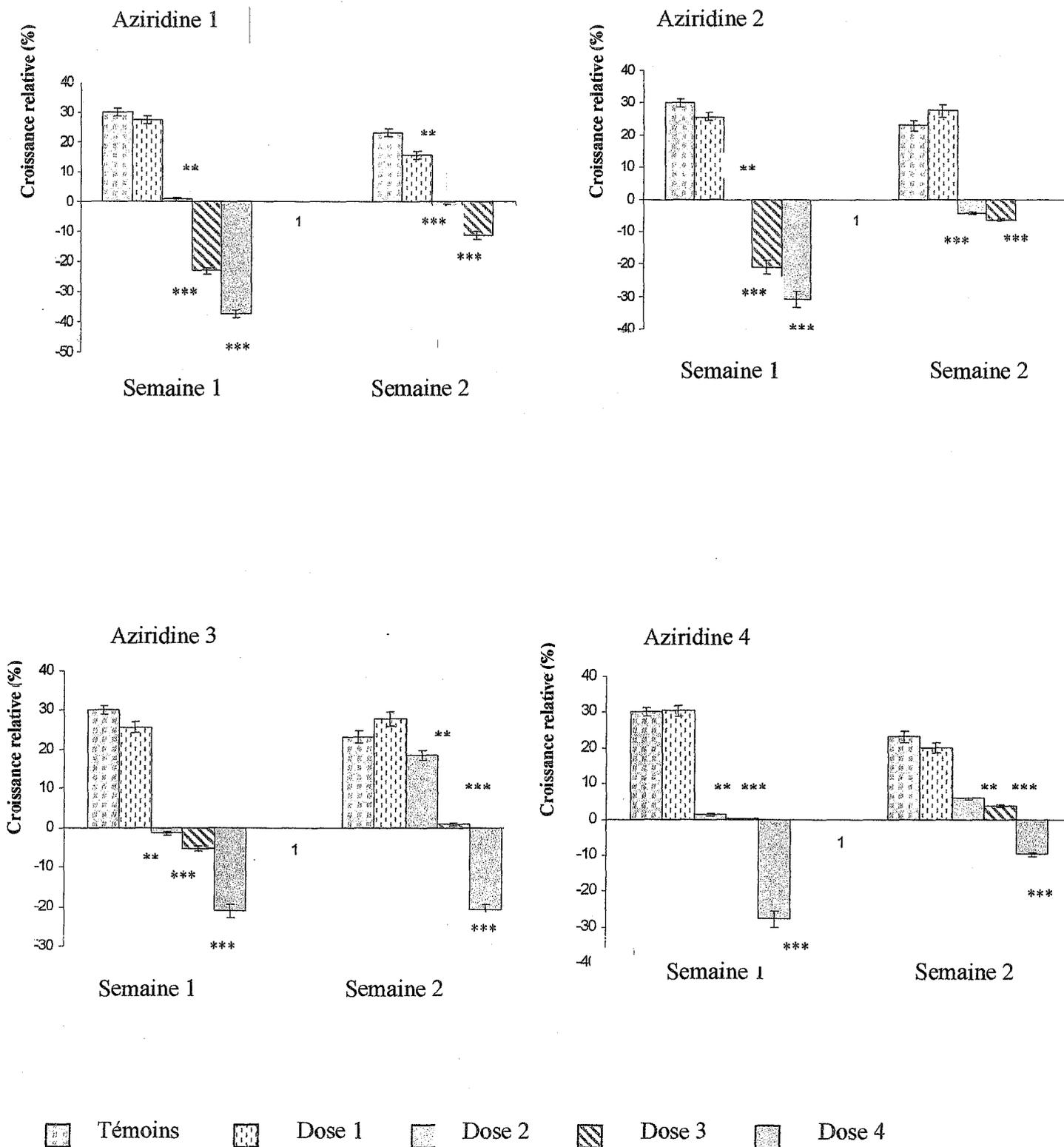


Figure 35: Evolution de la croissance relative (%) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. Dose 2: 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. Dose 3: 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. Dose 4: 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. Croissance relative= (poids final - poids initial) / poids initial \times 100. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001

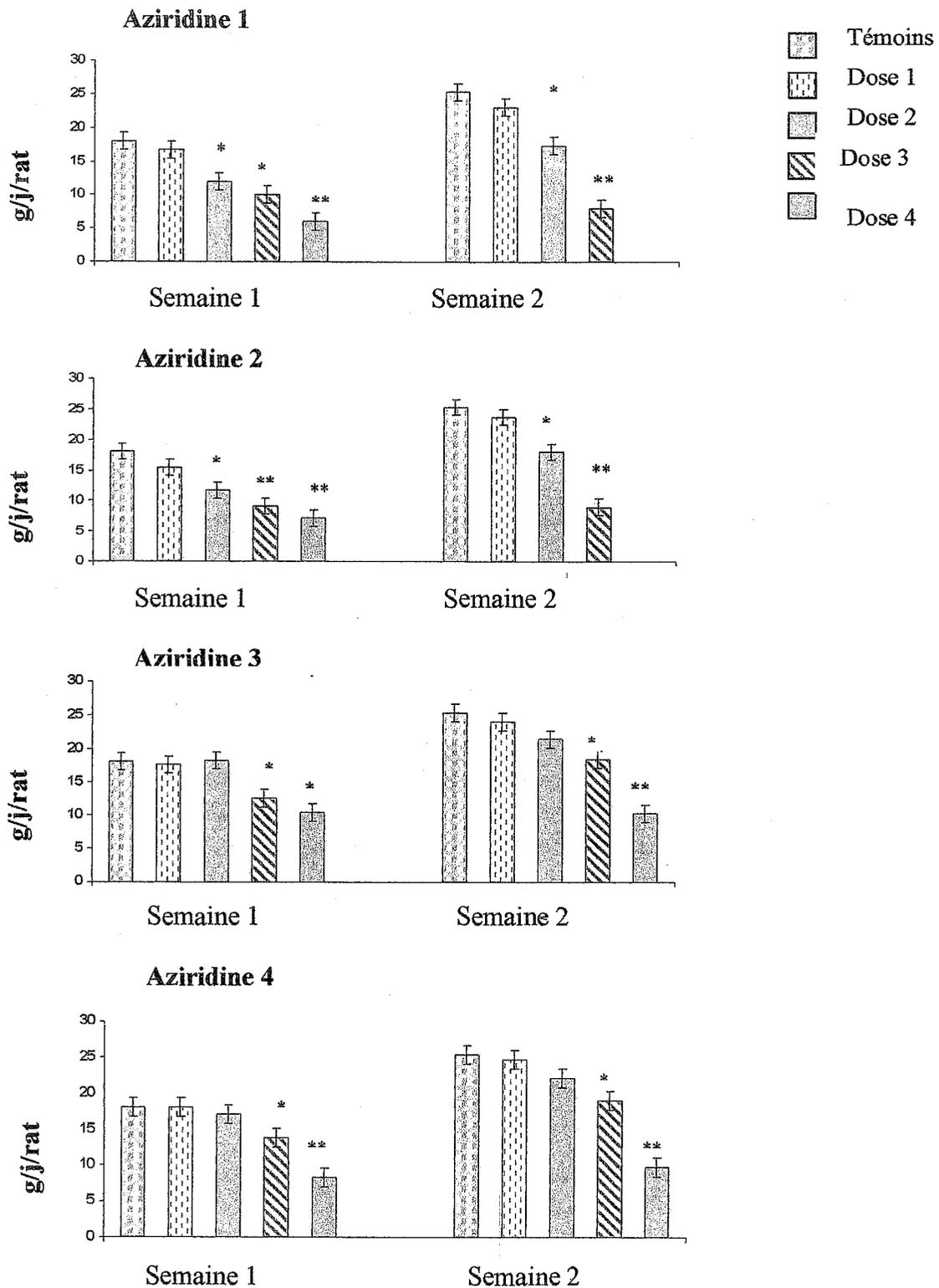


Figure36: Consommation alimentaire (g/j/ rat) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. Dose 2: 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. Dose 3: 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. Dose 4: 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

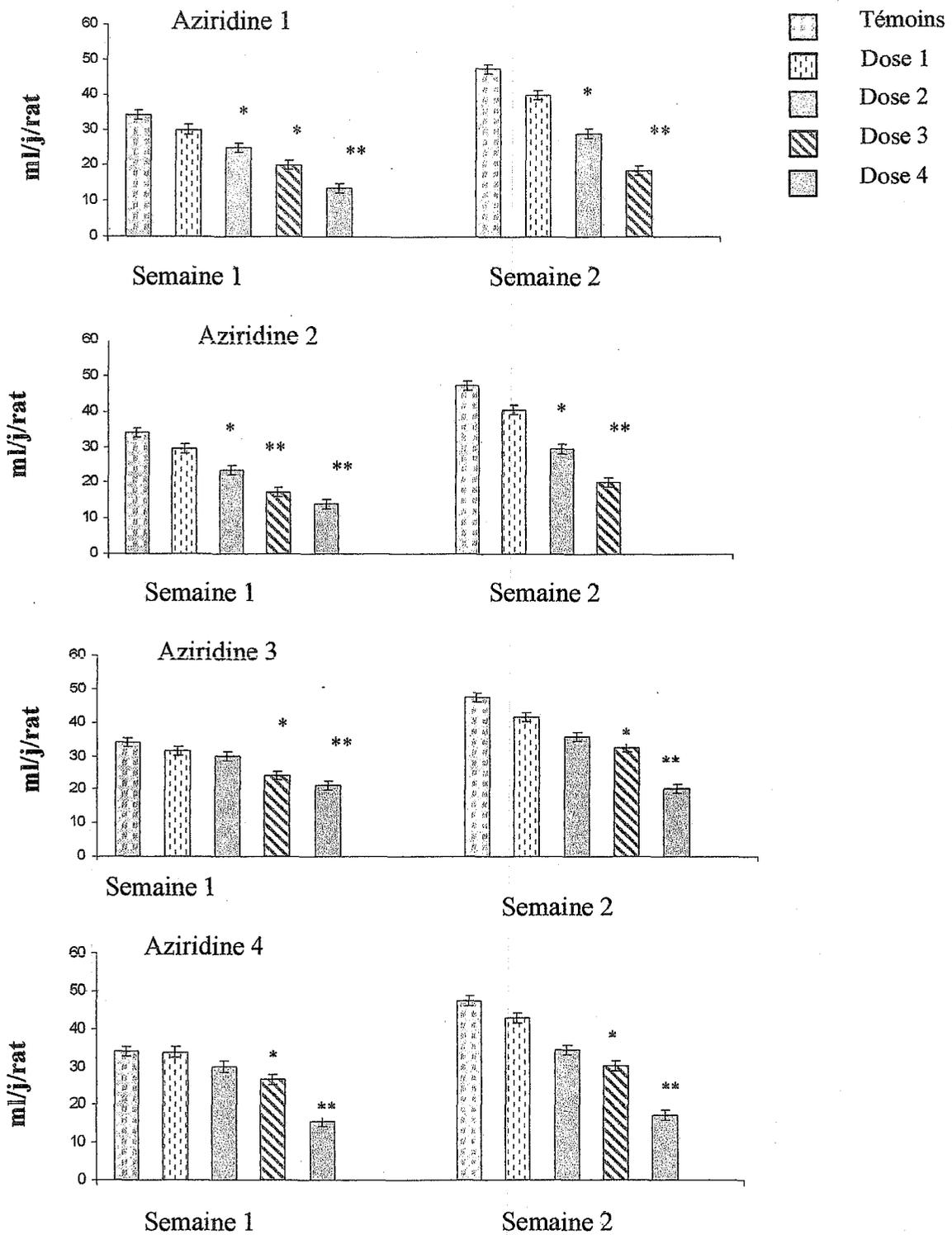


Figure 37: Ingestion d'eau (ml/j/rat) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

Dose 1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3; 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1; 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2; 35 mg/kg pour l'aziridine 3; 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1; 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2; 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3; 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 4:** 97.5 mg/kg pour l'aziridine 1; 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2; 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3; 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

(ml/j/rat) des rats expérimentaux comparés aux témoins durant les 14 jours d'expérimentation pour l'ensemble des aziridines testées (**Tableaux A 25, A 26 en Annexes et figures 36,37**).

Aux doses 2, 3 et 4 d'aziridine, l'excrétion fécale et urinaire sont fortement diminuées comparées aux rats témoins. Cette diminution est plus importante à la dose 4, et ceci quelque soit l'aziridine testée (**figures 36,37**).

II.5. Variation des paramètres hématologiques (figure 38)

A la fin de la période d'expérimentation (14 jours), tous les rats témoins et expérimentaux survivants sont sacrifiés. Le sang et les organes sont prélevés en vue des différents dosages selon les protocoles donnés dans la partie matériel et méthodes.

Les variations des paramètres hématologiques sont données dans le **Tableau A27 (en Annexes) et la figure 38**.

Quelque soit l'aziridine testée, l'injection de la première dose (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4) ne provoque pas de variations significatives des taux en globules blancs, globules rouges et en hémoglobine des rats expérimentaux comparés aux témoins. Suite à l'injection des autres doses supérieures à la dose 1 (dose 2, dose 3 et dose 4) d'aziridine 1, d'aziridine 3 et d'aziridine 4, les rats survivants présentent une augmentation significative des globules blancs accompagnée d'une diminution des globules rouges et de l'hémoglobine comparés aux témoins. Ces variations sont plus importantes à la dose 3 et à la dose 4 en présence de l'aziridine 3 et l'aziridine 4 (**figure 38**). L'injection de l'aziridine 2 à la dose 2 est associée à une diminution des globules blancs, des globules rouges et de l'hémoglobine. Cette diminution est fortement significative à la dose 3 (**figure 38**).

II.6. Variation des paramètres Biochimiques (figures 39- 41 et Tableaux A 28- A 31 en Annexe)

A la fin de l'expérimentation, tous les rats témoins et expérimentaux survivants sont pesés puis anesthésiés. Le sang est prélevé par ponction dans l'aorte abdominale, une quantité de sang est recueillie dans des tubes secs pour les tests biochimiques.

Les variations des paramètres biochimiques sont données dans les **tableaux A 28- A 31 (en Annexes) et les figures 39- 41.**

II.6.1. Effets des aziridines sur les teneurs sériques en lipides (figure 39 et Tableau A 28 en Annexe)

II.6.1.1. Teneurs sériques en cholestérol total

Chez les rats expérimentaux, l'injection de la première dose (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4) ne provoque aucune variation significative des teneurs sériques en cholestérol total par rapport à leurs témoins. Cependant, à la dose 2 quelque soit l'aziridine testée (26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4), les rats survivants montrent une chute de 21.42 % pour l'aziridine 1; 27.6 % pour l'aziridine 2; 18.57 % pour l'aziridine 3 et 28.57% pour l'aziridine 4 du taux de CT par rapport à leurs témoins.

Par ailleurs, une diminution significative du taux de CT chez les expérimentaux par rapport à leurs témoins, est notée à la dose 3 et à la dose 4. Elle est de 38.09 % pour l'aziridine 1; 39.52 % pour l'aziridine 2; 33.33 % à 46.66 % pour l'aziridine 3 et 35.71 % à 52.38 % pour l'aziridine 4 (**figure 39**).

II.6.1.2. Teneurs sériques en triglycérides

Quelque soit l'aziridine testée, l'injection de la première dose d'aziridine ne provoque pas de variations significatives des teneurs sériques en triglycérides comparés aux rats témoins. Aux doses supérieures à la dose 1 (dose 2, dose3 et dose 4) quelque soit l'aziridine testée, les rats expérimentaux montrent une diminution des TG comparés aux témoins. Cette diminution va respectivement de 28.8 % à 55.55 % en présence de l'aziridine 1; 35.55% à 53.33 % en présence de l'aziridine 2 ; 31.11% à 57.77 % en présence de l'aziridine 3 et 36.66 % à 61.11 % en présence de l'aziridine 4 (**figure 39**).

II.6.1.3. Teneurs sériques en phospholipides (PL)

Au niveau sérique, les PL ne montrent aucune variation chez les différents groupes de rats traités par l'aziridine à la dose 1. Aux doses supérieures à la dose 1 (dose 2, dose3 et dose 4) quelque soit l'aziridine testée, les PL diminuent significativement chez les rats expérimentaux comparés aux rats témoins ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (**Tableau A 28 en Annexe et figure 39**).

II.6.2. Effets des aziridines sur les teneurs sériques en protéines (figure 40 et Tableau A 29 en Annexe)

Quelque soit l'aziridine testée, suite à l'injection de la première dose (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4), les rats expérimentaux ne montrent pas de variations significatives des teneurs en protéines totales comparés à leurs témoins. Cependant à la dose 2, 3 et 4, quelque soit l'aziridine testée, les différents groupes de rats expérimentaux montrent une diminution des protéines totales comparées aux témoins. Cette diminution va respectivement de 11.42 % à 19.06 % en présence de l'aziridine

1; 8.25% à 14.91 % en présence de l'aziridine 2 ; 6.20% à 24.91 % en présence de l'aziridine 3 et 6.96 % à 23.73 % en présence de l'aziridine 4 (figure 40).

II.6.3. Effets des aziridines sur les teneurs sériques en glucose (figure 40)

Au niveau sérique, les rats expérimentaux ne montrent pas de variations significatives des teneurs en glucose pour l'ensemble des aziridines testées à la dose 1 comparées aux valeurs des témoins. Suite à l'injection des autres doses supérieures à la dose 1 (dose 2, dose3 et dose 4) d'aziridine, les rats survivants présentent une diminution significative des taux en glucose. Cette diminution est de 19.6 % à 24 % en présence de l'aziridine 1 ; 25.4 % à 31 % en présence de l'aziridine 2 ; 18.6% à 32% en présence de l'aziridine 3 et 16.8 % à 34% en présence de l'aziridine 4.

II.6.4. Effets des aziridines sur les teneurs sériques en créatinine, en urée et en acide urique (figure 41 et Tableau A 30)

Quelque soit l'aziridine testée, suite à l'injection de la première dose 1 d'aziridine, les teneurs sériques en créatinine, en urée et en acide urique ne montrent aucune variation significative chez les différents groupes de rats traités par rapport à leurs témoins.

Par ailleurs, une augmentation des taux en créatinine, urée et en acide urique chez les rats expérimentaux par rapport aux témoins est notée à la dose 2, 3 et 4 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (figure 41).

II.6.5. Effets des aziridines sur les teneurs urinaires en créatinine, en urée et en acide urique (figure 42 et Tableau A 31 en Annexe)

Les urines sont récupérées chaque jour, le matin à la même heure, puis centrifugés à 3000 t/min, et conservées à 4° C en vue de réaliser des différents dosages urinaires selon les protocoles donnés dans la partie matériel et méthodes.

Les teneurs en créatinine, en urée et en acide urique au niveau des urines ne montrent aucune différence significative chez les groupes de rats ayant reçu l'aziridine à la dose 1 par rapport à leurs témoins. Comparés à leurs témoins, les rats expérimentaux présentent une diminution significative des teneurs urinaires aux doses supérieures (dose 2, dose3 et dose 4). Cette diminution est plus importante aux doses 3 et 4 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (figure 42).

III. Effets des aziridines sur le poids et la composition des organes (Tableaux 10-12)

III.1. Poids des différents organes

Quelque soit l'aziridine testée, suite à l'injection de la première dose (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4), les poids des différents organes (foie, rein, rate, pancréas, cœur, tissu adipeux, muscle, et le cerceau) chez les rats expérimentaux restent stable par rapport à leurs témoins. Par contre, l'injection des autres doses (les doses 2, 3 et 4) est associée à une diminution des poids des différents organes. Cette diminution est plus importante aux doses 3 et 4, quelque soit l'aziridine testée (Tableau 10)

III.2. Teneurs en lipides totaux des organes

Les teneurs en lipides totaux des différents organes (le foie, la rate, le muscle gastrocnémien, le pancréas, le rein, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux) ne montrent aucune différence chez les groupes de rats traités par l'ensemble des aziridines à la dose 1 par rapport à leurs témoins. Par contre, l'injection des autres doses (la dose 2, 3 et 4) est associée à une diminution des teneurs en lipides totaux des différents organes. Cette diminution est plus importante aux doses 3 et 4, quelque soit l'aziridine testée (Tableau 11).

III.3. Teneurs en protéines totales des organes

Les teneurs en protéines totales des différents organes (le foie, la rate, le muscle gastrocnémien, le pancréas, le rein, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux) ne montrent aucune différence chez les groupes de rats traités par l'ensemble des aziridines à la dose 1 par rapport à leurs témoins. Par contre, l'injection des autres doses (doses 2, 3 et 4) est associée à une diminution des teneurs en protéines totales des différents organes (**Tableau 12**).

III.4. Activités des transaminases hépatiques

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules. Leur augmentation sérique reflète une lésion cellulaire en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire (Valdiguie, 2000).

Les valeurs moyennes des transaminases (TGO et TGP) sont restées dans les limites normales chez tous les groupes de rats expérimentaux comparées à leurs témoins, suite à l'injection de la première dose d'aziridine (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). Cependant une augmentation significative ($p < 0.05$, $p < 0.01$) des transaminases est notée chez les rats expérimentaux par rapport à leurs témoins, après injection de la dose 2, 3 et 4 et ceci quelque soit l'aziridine testée (**figure 43 et Tableau A 32 en Annexe**).

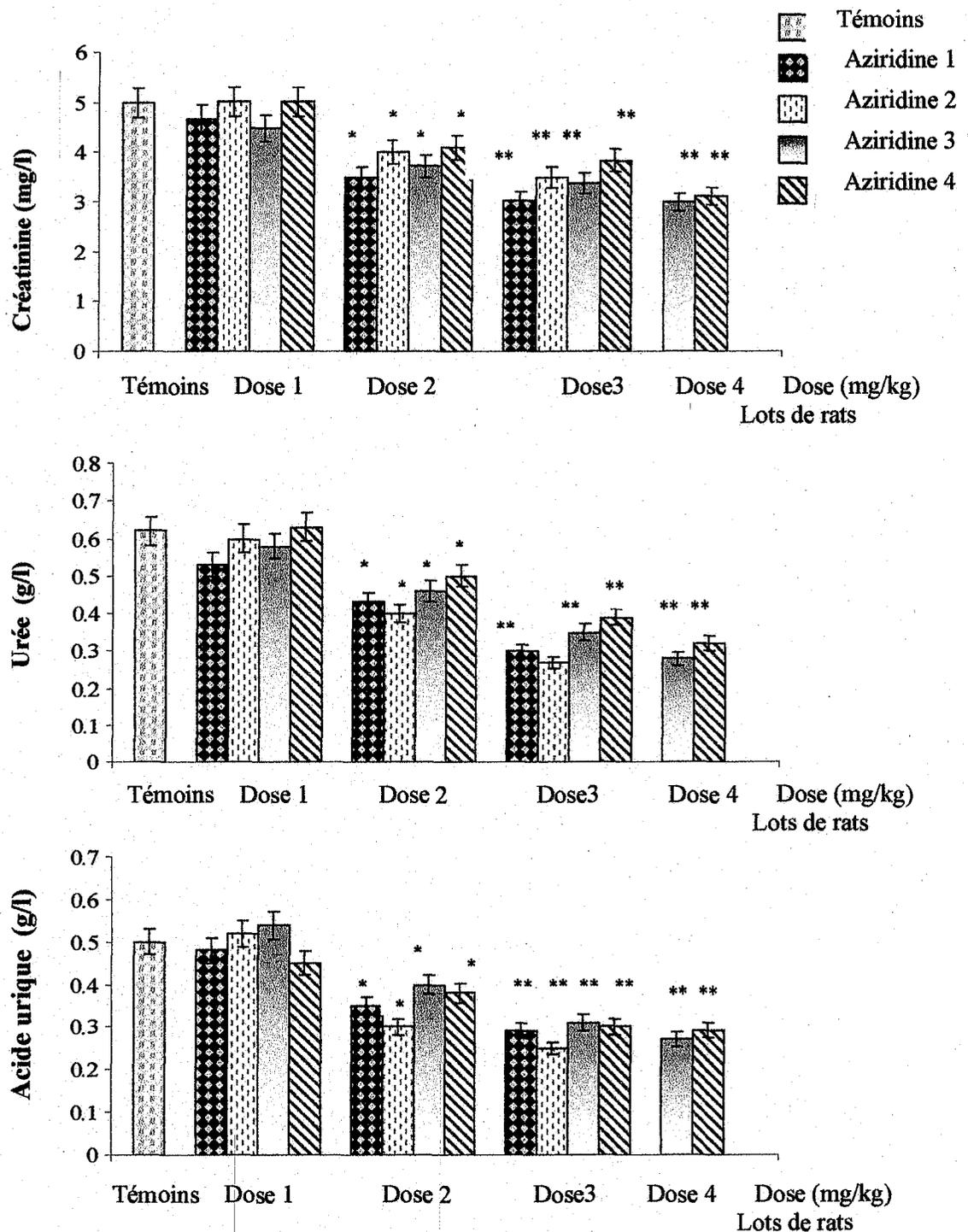


Figure 42: Valeurs moyennes des teneurs urinaires en créatinine, en urée et en acide urique chez les rats témoins et expérimentaux.

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3; 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1; 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2; 35 mg/kg pour l'aziridine 3; 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1; 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2; 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3; 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 4:** 97.5mg/kg pour l'aziridine 1; 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2; 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3; 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau 10: Poids moyen des organes exprimé en (g) des rats témoins et expérimentaux.

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Foie</u>				
Témoins	8.71 ± 1.42	8.71 ± 1.42	8.71 ± 1.42	8.71 ± 1.42
Dose 1	8.25 ± 1.30	8.32 ± 1.10	8.54 ± 0.83	8.65 ± 1.10
Dose 2	5.63 ± 0.53*	5.11 ± 0.23*	8.30 ± 0.53*	8.16 ± 0.50*
Dose 3	3.70 ± 0.50**	4 ± 0.75**	5.44 ± 0.30**	5.64 ± 0.71**
Dose 4	/	/	3.52 ± 0.71**	3.56 ± 1.22**
<u>Rein</u>				
Témoins	1.74 ± 0.42	1.74 ± 0.42	1.74 ± 0.42	1.74 ± 0.42
Dose 1	1.6 ± 0.83	1.66 ± 0.50	1.7 ± 0.61	1.68 ± 0.11
Dose 2	1.22 ± 0.16*	1.02 ± 0.02*	1.65 ± 0.44*	1.6 ± 0.24*
Dose 3	0.73 ± 0.05**	0.81 ± 0.06**	1.05 ± 0.01**	1.12 ± 0.07**
Dose 4	/	/	0.7 ± 0.03**	0.71 ± 0.02**
<u>Rate</u>				
Témoins	1.54 ± 0.16	1.54 ± 0.16	1.54 ± 0.16	1.54 ± 0.16
Dose 1	1.4 ± 0.10	1.49 ± 0.12	1.52 ± 0.28	1.5 ± 0.20
Dose 2	0.94 ± 0.07*	0.90 ± 0.03*	1.47 ± 0.71*	1.42 ± 0.11*
Dose 3	0.64 ± 0.04**	0.70 ± 0.01**	0.92 ± 0.10**	0.9 ± 0.15**
Dose 4	/	/	0.61 ± 0.02**	0.63 ± 0.42**
<u>Pancréas</u>				
Témoins	0.9 ± 0.06	0.9 ± 0.06	0.9 ± 0.06	0.9 ± 0.06
Dose 1	0.85 ± 0.01	0.86 ± 0.05	0.88 ± 0.01	0.89 ± 0.02
Dose 2	0.58 ± 0.03*	0.52 ± 0.09*	0.83 ± 0.03*	0.82 ± 0.01*
Dose 3	0.37 ± 0.04**	0.4 ± 0.02**	0.55 ± 0.01**	0.59 ± 0.05**
Dose 4	/	/	0.34 ± 0.02**	0.36 ± 0.02**
<u>Coeur</u>				
Témoins	1.6 ± 0.01	1.6 ± 0.01	1.6 ± 0.01	1.6 ± 0.01
Dose 1	1.47 ± 0.03	1.52 ± 0.02	1.55 ± 0.03	1.57 ± 0.01
Dose 2	1.02 ± 0.01*	0.93 ± 0.05*	1.50 ± 0.02*	1.48 ± 0.03*
Dose 3	0.72 ± 0.02**	0.70 ± 0.01**	1.02 ± 0.01**	1.04 ± 0.02**
Dose 4	/	/	0.66 ± 0.01**	0.68 ± 0.04**

<u>Tissu adipeux</u>				
Témoins	0.86 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.86 ± 0.01
Dose 1	0.8 ± 0.02	0.82 ± 0.04	0.84 ± 0.02	0.8 ± 0.02
Dose 2	0.52 ± 0.03*	0.5 ± 0.01*	0.8 ± 0.01*	0.75 ± 0.05*
Dose 3	0.35 ± 0.04**	0.37 ± 0.03**	0.53 ± 0.02**	0.55 ± 0.03**
Dose 4	/	/	0.34 ± 0.01**	0.35 ± 0.02**
<u>Muscle</u>				
Témoins	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.01
Dose 1	0.54 ± 0.03	0.58 ± 0.01	0.57 ± 0.06	0.6 ± 0.01
Dose 2	0.37 ± 0.03*	0.35 ± 0.05*	0.53 ± 0.03*	0.57 ± 0.05*
Dose 3	0.27 ± 0.04**	0.28 ± 0.01**	0.39 ± 0.01**	0.36 ± 0.01**
Dose 4	/	/	0.24 ± 0.04**	0.25 ± 0.01**
<u>Cerveau</u>				
Témoins	1.32 ± 0.02	1.32 ± 0.02	1.32 ± 0.02	1.32 ± 0.02
Dose 1	1.25 ± 0.01	1.26 ± 0.03	1.30 ± 0.01	1.29 ± 0.01
Dose 2	0.87 ± 0.03*	0.77 ± 0.01*	1.23 ± 0.01*	1.21 ± 0.02*
Dose 3	0.54 ± 0.04**	0.58 ± 0.02**	0.88 ± 0.01**	0.85 ± 0.02**
Dose 4	/	/	0.52 ± 0.03**	0.54 ± 0.01**

Dose 1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine 3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 4:** 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau 11: Teneurs en lipides totaux des organes exprimées en (mg/g tissu) chez les rats témoins et expérimentaux.

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Foie</u>				
Témoins	60.25 ± 2.52	60.25 ± 2.52	60.25 ± 2.52	60.25 ± 2.52
Dose 1	56.4 ± 2.30	57.54 ± 1.40	57.23 ± 1.30	58.83 ± 1.42
Dose 2	40.06 ± 1.34*	37.54 ± 1.14*	54.09 ± 2.40*	53.69 ± 2.57*
Dose 3	26 ± 1.57**	25.09 ± 1.27**	39 ± 1.25**	41.07 ± 1.50**
Dose 4	/	/	24.34 ± 1.71**	25 ± 1.64**
<u>Rein</u>				
Témoins	38 ± 3.48	38 ± 3.48	38 ± 3.48	38 ± 3.48
Dose 1	35 ± 2.83	34.98 ± 1.86	36.55 ± 1.50	37 ± 1.23
Dose 2	28 ± 1.66*	25.7 ± 1.60*	32.75 ± 1.10*	34.94 ± 1.00*
Dose 3	19.4 ± 1.05**	16 ± 1.40**	27 ± 1.36**	25.34 ± 1.42**
Dose 4	/	/	15.72 ± 2.03**	17.02 ± 1.21**
<u>Rate</u>				
Témoins	37.6 ± 2.14	37.6 ± 2.14	37.6 ± 2.14	37.6 ± 2.14
Dose 1	34 ± 2.31	32.87 ± 2.55	35 ± 2.04	33.75 ± 2.11
Dose 2	20.05 ± 2.06*	22 ± 1.88*	32.10 ± 1.31*	29.65 ± 1.11*
Dose 3	16.14 ± 2.55**	15.83 ± 2.01**	19.65 ± 2.10**	21 ± 2.53**
Dose 4	/	/	15 ± 1.82**	116.05 ± 1.15**
<u>Pancréas</u>				
Témoins	85 ± 5.06	85 ± 5.06	85 ± 5.06	85 ± 5.06
Dose 1	82.27 ± 4.01	80.64 ± 3.51	84 ± 3.00	81 ± 2.80
Dose 2	55 ± 2.73*	56 ± 2.30*	76 ± 2.46*	72 ± 2.18*
Dose 3	42 ± 3.04**	39.09 ± 3.10**	53.7 ± 2.15**	57.08 ± 2.01**
Dose 4	/	/	40 ± 2.82**	38.73 ± 2.17**
<u>Coeur</u>				
Témoins	54 ± 4.08	54 ± 4.08	54 ± 4.08	54 ± 4.08
Dose 1	51.08 ± 2.73	52.73 ± 2.10	52.31 ± 2.51	53.02 ± 2.16
Dose 2	37 ± 3.01*	34.47 ± 4.11*	44.67 ± 4.00*	48 ± 3.10*
Dose 3	28 ± 2.52**	25.54 ± 1.43**	36 ± 1.30**	35 ± 1.46**
Dose 4	/	/	24.33 ± 2.01**	24 ± 2.11**

<u>Tissu adipeux</u>				
Témoins	250 ± 21.50	250 ± 21.50	250 ± 21.50	250 ± 21.50
Dose 1	230.55 ± 19.02	241 ± 17.40	243.58 ± 10.02	238 ± 16.52
Dose 2	179 ± 20.03*	163.34 ± 21.45*	235 ± 21.23*	232 ± 18.14*
Dose 3	124.7 ± 18.34**	122.55 ±	170 ± 20.44**	159 ± 23.00**
Dose 4	/	19.25**	121 ± 18.01**	123.06 ± 17.82**
<u>Muscle</u>				
Témoins	44.5 ± 5.60	44.5 ± 5.60	44.5 ± 5.60	44.5 ± 5.60
Dose 1	39 ± 4.03	42.42 ± 3.72	40.58 ± 4.22	42.7 ± 2.13
Dose 2	32 ± 4.22*	31.09 ± 2.82*	34 ± 3.32*	37 ± 3.20*
Dose 3	28.99 ± 5.04**	26 ± 4.11**	29.45 ± 4.04**	31.09 ± 3.14**
Dose 4	/	/	25.26 ± 3.27**	27 ± 2.01**
<u>Cerveau</u>				
Témoins	52 ± 4.50	52 ± 4.50	52 ± 4.50	52 ± 4.50
Dose 1	47.24 ± 4.01	49.7 ± 4.21	50.21 ± 3.98	50.81 ± 4.30
Dose 2	43 ± 4.13*	40.33 ± 3.60*	45 ± 3.16*	47.66 ± 3.73*
Dose 3	27.66 ± 3.24**	26.07 ± 3.30**	38.76 ± 3.44**	36.98 ± 3.40**
Dose 4	/	/	27 ± 2.63**	28.02 ± 3.10**

Dose 1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine 3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 4:** 97.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau 12: Teneurs en protéines totales des organes exprimées en (mg/g tissu) chez les rats témoins et expérimentaux. → (Ex)

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Foie</u>				
Témoins	180 ± 32.62	180 ± 32.62	180 ± 32.62	180 ± 32.62
Dose 1	173.47 ± 27.88	171.98 ± 30.18	176 ± 25.60	178.76 ± 12.75
Dose 2	141.16 ± 31.34*	136 ± 35.24*	171 ± 30.04*	163.68 ± 32.15*
Dose 3	86 ± 32.50**	82 ± 30.70**	112.42 ± 34.00**	115 ± 28.50**
Dose 4	/	/	84 ± 26.71**	82.76 ± 16.64**
<u>Rein</u>				
Témoins	100 ± 5.48	100 ± 5.48	100 ± 5.48	100 ± 5.48
Dose 1	94 ± 3.83	96.40 ± 2.10	98 ± 1.32	96 ± 2.15
Dose 2	72 ± 3.66*	60.07 ± 2.12*	94.82 ± 1.72*	87.08 ± 3.12*
Dose 3	43.34 ± 3.05**	42.78 ± 1.05**	60 ± 1.75**	64 ± 2.05**
Dose 4	/	/	40.65 ± 2.03**	40 ± 1.90**
<u>Rate</u>				
Témoins	88 ± 2.14	88 ± 2.14	88 ± 2.14	88 ± 2.14
Dose 1	80 ± 2.31	86.6 ± 2.01	85 ± 2.11	86 ± 2.61
Dose 2	54 ± 2.06*	52 ± 2.34*	61 ± 2.64*	56.72 ± 1.76*
Dose 3	37.14 ± 2.55**	36.92 ± 2.05**	48.23 ± 2.12**	45 ± 3.55**
Dose 4	/	/	35 ± 1.82**	36.05 ± 1.15**
<u>Pancréas</u>				
Témoins	150 ± 8.06	150 ± 8.06	150 ± 8.06	150 ± 8.06
Dose 1	143 ± 10.01	141.66 ± 13.21	146 ± 5.01	148 ± 3.60
Dose 2	100.07 ± 12.73*	98.46 ± 20.28*	134 ± 11.03*	136 ± 4.03*
Dose 3	83 ± 5.04**	80.2 ± 3.10**	96.66 ± 4.24**	98 ± 2.64**
Dose 4	/	/	80 ± 6.82**	84.3 ± 2.17**
<u>Coeur</u>				
Témoins	70 ± 4.08	70 ± 4.08	70 ± 4.08	70 ± 4.08
Dose 1	64 ± 2.73	66 ± 2.13	67 ± 2.80	68 ± 2.00
Dose 2	44 ± 3.01*	40 ± 2.81*	53 ± 2.51*	62 ± 1.91*
Dose 3	30 ± 2.52**	30 ± 2.52**	33 ± 2.02**	35 ± 1.52**
Dose 4	/	/	28.96 ± 2.01**	30 ± 2.11**

<u>Tissu adipeux</u>				
Témoins	25 ± 1.50	25 ± 1.50	25 ± 1.50	25 ± 1.50
Dose 1	23 ± 1.90	22.56 ± 0.78	24 ± 0.76	23.38 ± 0.65
Dose 2	18 ± 2.01*	15 ± 0.81*	21.08 ± 0.61*	20.94 ± 0.28*
Dose 3	13 ± 0.34**	11.87 ± 0.55**	15.73 ± 0.44**	16 ± 0.66**
Dose 4	/	/	12.06 ± 0.31**	12 ± 0.82**
<u>Muscle</u>				
Témoins	90 ± 4.60	90 ± 4.60	90 ± 4.60	90 ± 4.60
Dose 1	83 ± 4.03	79 ± 5.20	84 ± 4.00	88 ± 3.70
Dose 2	58 ± 4.22*	54 ± 4.52*	78 ± 4.02*	82 ± 1.80*
Dose 3	42 ± 5.04**	41 ± 3.10**	57 ± 3.76**	53 ± 3.24**
Dose 4	/	/	40 ± 3.27**	44 ± 2.01**
<u>Cerveau</u>				
Témoins	52 ± 4.50	52 ± 4.50	52 ± 4.50	52 ± 4.50
Dose 1	47.24 ± 4.01	49.7 ± 4.21	50.21 ± 3.98	50.81 ± 4.30
Dose 2	43 ± 4.13*	40.33 ± 3.60*	45 ± 3.16*	47.66 ± 3.73*
Dose 3	27.66 ± 3.24**	26.07 ± 3.30**	38.76 ± 3.44**	36.98 ± 3.40**
Dose 4	/	/	27 ± 2.63**	28.02 ± 3.10**

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 4:** 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

IV. Bilans nutritionnels

Les bilans nutritionnels sont réalisés chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux recevant une dose d'aziridine sans effet toxique (NOAEL; No Observed Adverse Effect Level), sur une période de un mois. Nos résultats précédents montrent que la NOAEL est de 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4.

Afin de déterminer les effets des aziridines sur la consommation alimentaire et sur la digestibilité des nutriments, les bilans nutritionnels sont évalués au cours de la première semaine (BI) et la dernière semaine (BII) du mois d'expérimentation.

IV.1. Gain pondéral quotidien (Tableau 13)

Au cours de la première semaine (BI) et la dernière semaine (BII) du mois d'expérimentation, les rats témoins (recevant une injection d'eau physiologique) présentent un gain quotidien similaire à celui des rats expérimentaux (recevant la dose NOAEL d'aziridine testée), quelque soit l'aziridine testée.

IV.2. consommation alimentaire, apport énergétique et rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) (figure 44 et Tableau A 33- A 35 en Annexe)

Quelque soit le bilan (BI ou BII), la consommation alimentaire (exprimée en g/j/rat) des rats témoins est similaire à celle des rats expérimentaux (recevant la dose NOAEL) et ceci quelque soit l'aziridine testée (**figure 44 et Tableau A 33 en Annexe**).

Les mêmes résultats sont obtenus concernant l'apport énergétique et le rapport d'efficacité nutritionnelle. En effet, aucune différence n'est notée entre les groupes de rats traités par l'aziridine par rapport à leurs témoins (**figure 44, Tableau A 34 et A 35 en Annexe**

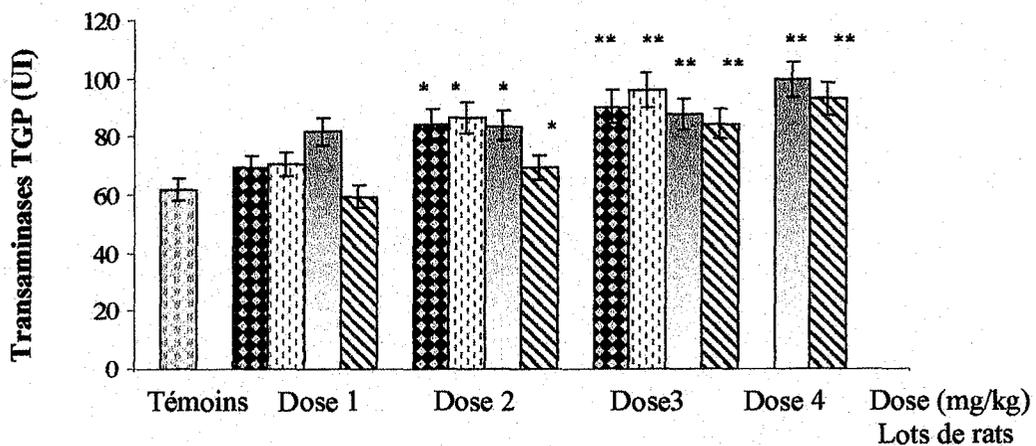
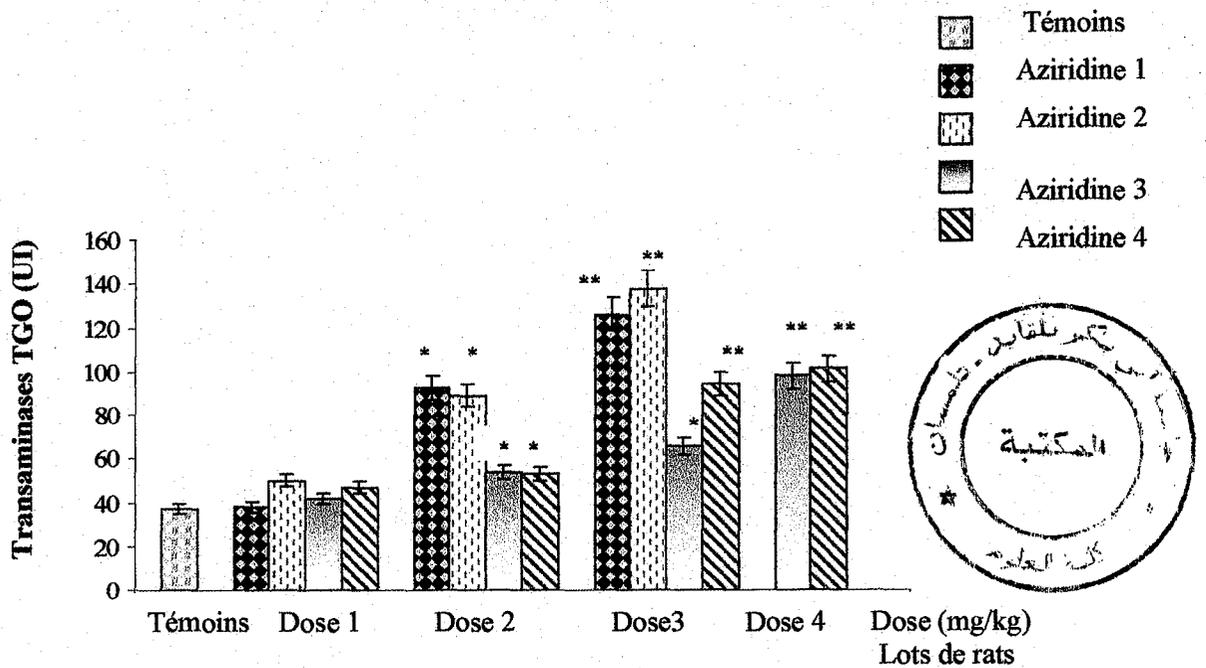


Figure 43: Valeurs moyennes des concentrations de transaminases (TGO et TGP) exprimées en (UI) chez les rats témoins et expérimentaux.

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2; 8.75 mg/kg pour l'aziridine3; 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1; 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2; 35 mg/kg pour l'aziridine3; 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1; 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2; 87.5 mg/kg pour l'aziridine3; 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 4:** 97.5mg/kg pour l'aziridine 1; 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2; 131.25 mg/kg pour l'aziridine3; 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

IV.3. Azote ingéré et excrété (figure 45 et Tableau A 36 en Annexe)

Azote ingéré : L'évolution de l'azote ingéré est corrélée à celle de la nourriture ingérée. Quelque soit l'aziridine testée, l'injection de la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3 et 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4) ne provoque pas de variations significatives de l'azote ingéré (exprimée en mg/j/rat) chez les rats expérimentaux comparés aux témoins au cours des bilans nutritionnels BI et BII.

Azote excrété : L'injection de la dose NOAEL chez les rats expérimentaux ne provoque pas de variations significatives de l'azote excrété (exprimé en mg/j/rat), fécal ou urinaire, comparés aux témoins durant les bilans nutritionnels BI et BII (**figure 45 et Tableau A 36 en Annexe**).

IV.4. coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote (CUD_N) et bilan azoté (BA) (figure 46 et Tableau A 37 en Annexe)

Chez les rats expérimentaux, suite à l'injection de la dose NOAEL quelque soit l'aziridine testée, les CUD_N et les BA restent similaires à ceux des témoins au cours des bilans nutritionnels BI et BII.

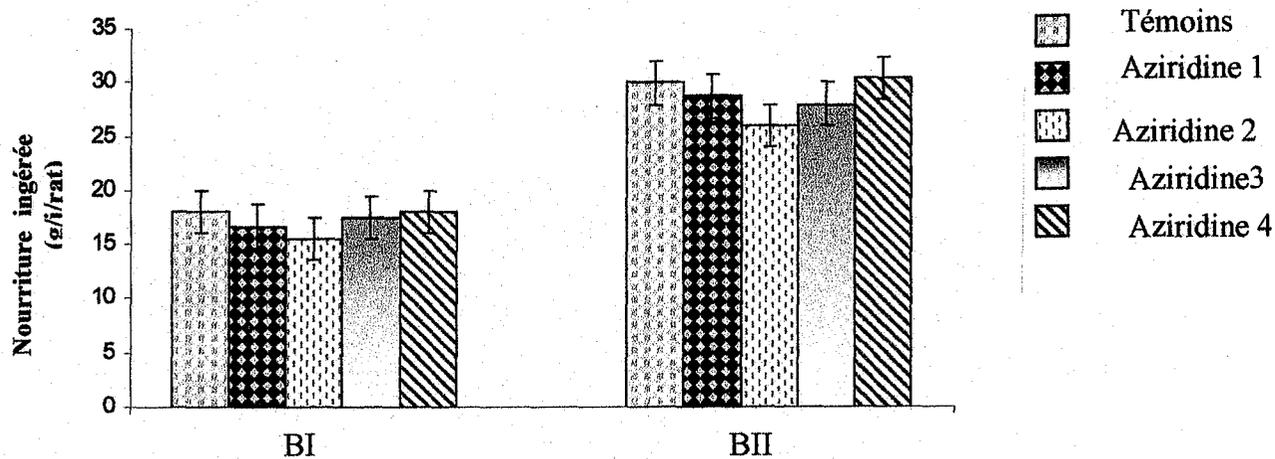
IV.5. Lipides ingérés et excrétés et coefficient d'utilisation digestive apparente des lipides (CUD_L) (figure 47 et Tableau A 38 en Annexe)

Les quantités de lipides ingérés (mg/j/rat) par les groupes de rats recevant les quatre aziridines à la dose NOAEL sont semblables à celles des rats témoins aux deux bilans BI et BII. Il en est de même pour l'excrétion fécale des lipides (mg/j/rat), ainsi que les CUD_L qui ne varient pas significativement entre les différents lots de rats.

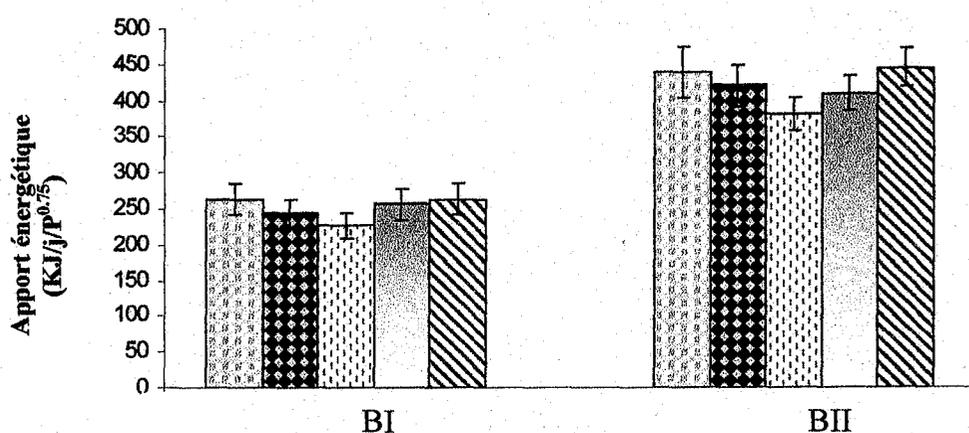
Tableau 13: Gain pondéral quotidien exprimé en (g/j/rat) chez les rats témoins et expérimentaux.

Lots de rats	Gain pondéral quotidien (g/j/rat)	
	BI	BII
Témoins	8.88 ± 0.69	7.05 ± 1.10
Aziridine 1	8.01 ± 0.73	6.78 ± 0.88
Aziridine 2	7.66 ± 0.94	6.04 ± 0.76
Aziridine 3	7.58 ± 0.82	7.10 ± 0.83
Aziridine 4	8.90 ± 0.71	7.38 ± 1.04

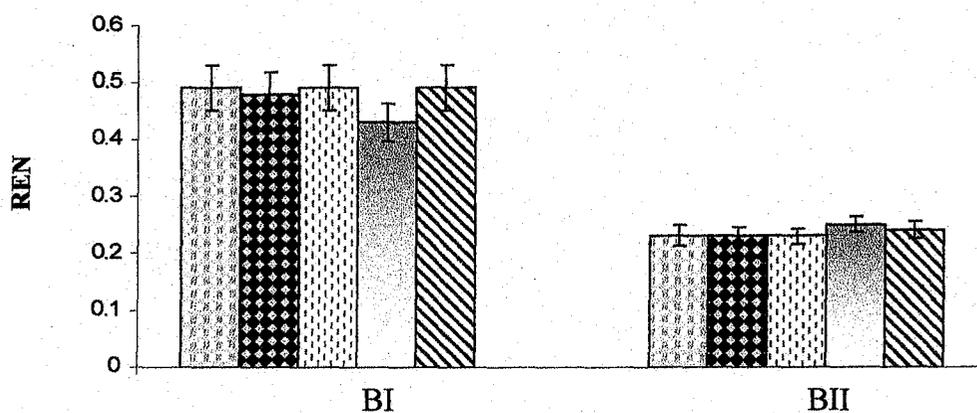
Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ± ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.



Bilans



Bilans



Bilans

Figure 44: Apport énergétique, nourriture ingérée et rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) au cours des bilans nutritionnels, chez les rats témoins et expérimentaux.

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne \pm ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

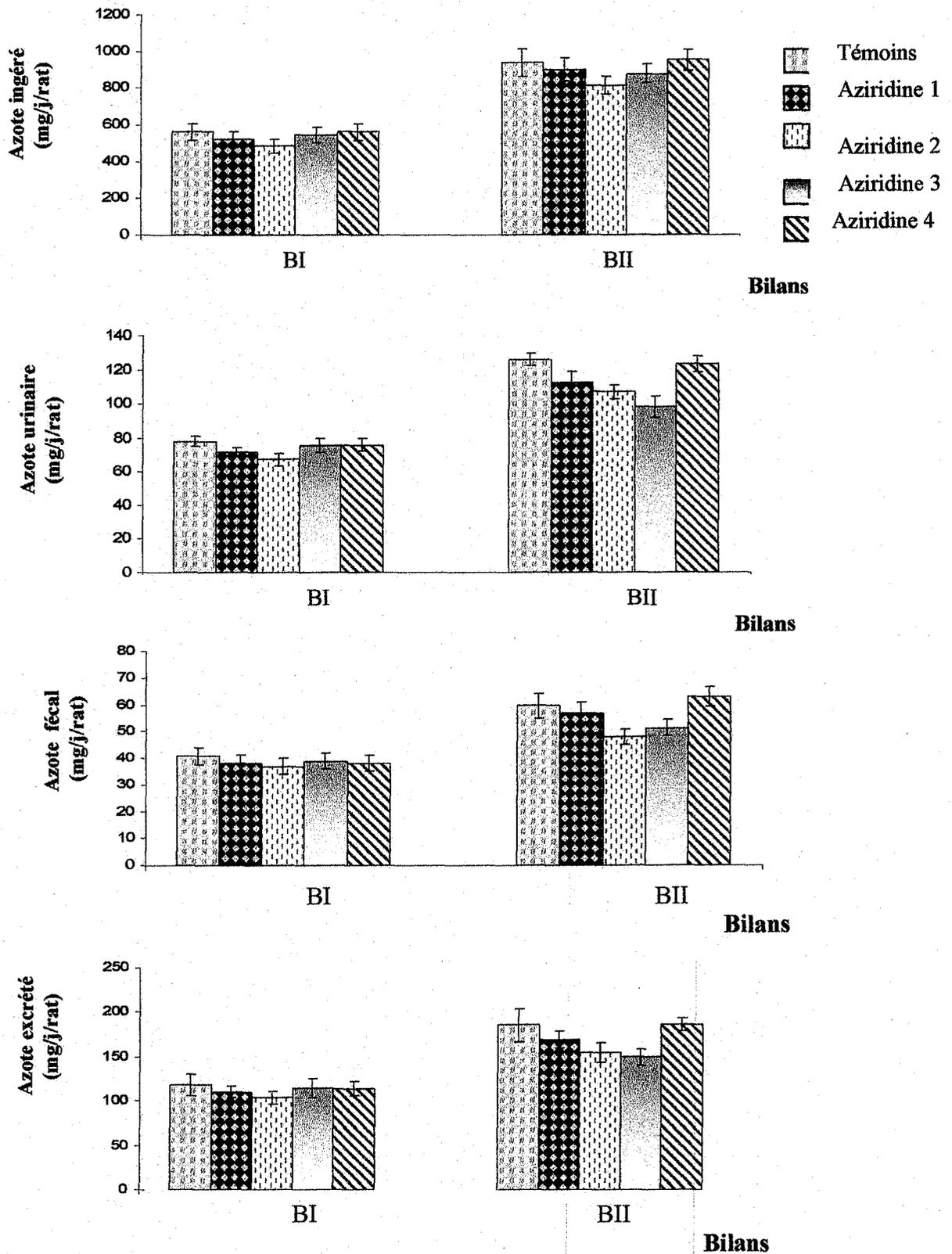


Figure 45: Azote ingéré, urinaire, fécal, et excrété chez les rats témoins et expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne \pm ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

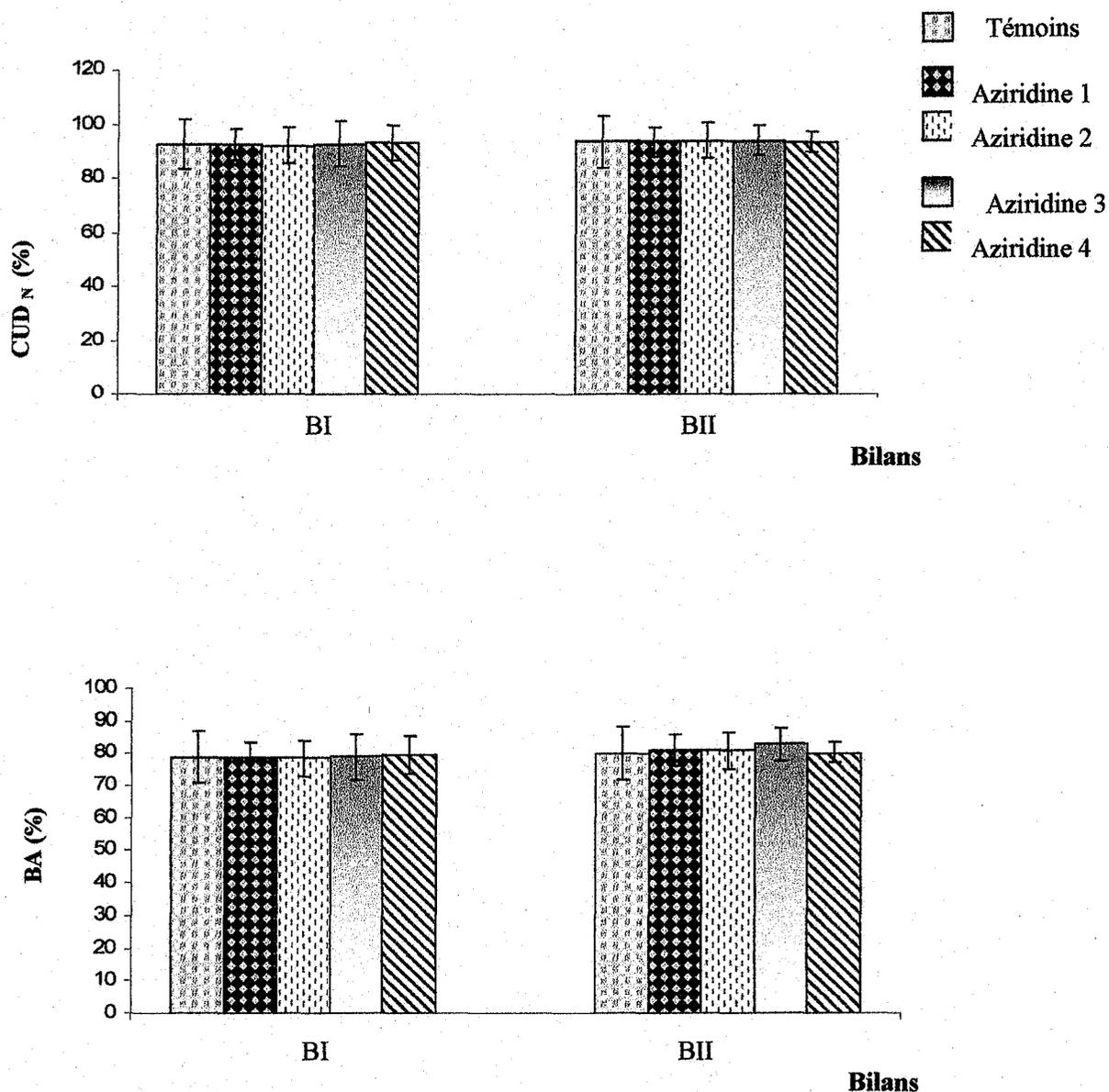


Figure 46: Coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote (CUD_N) et Bilan azoté (BA) chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ± ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

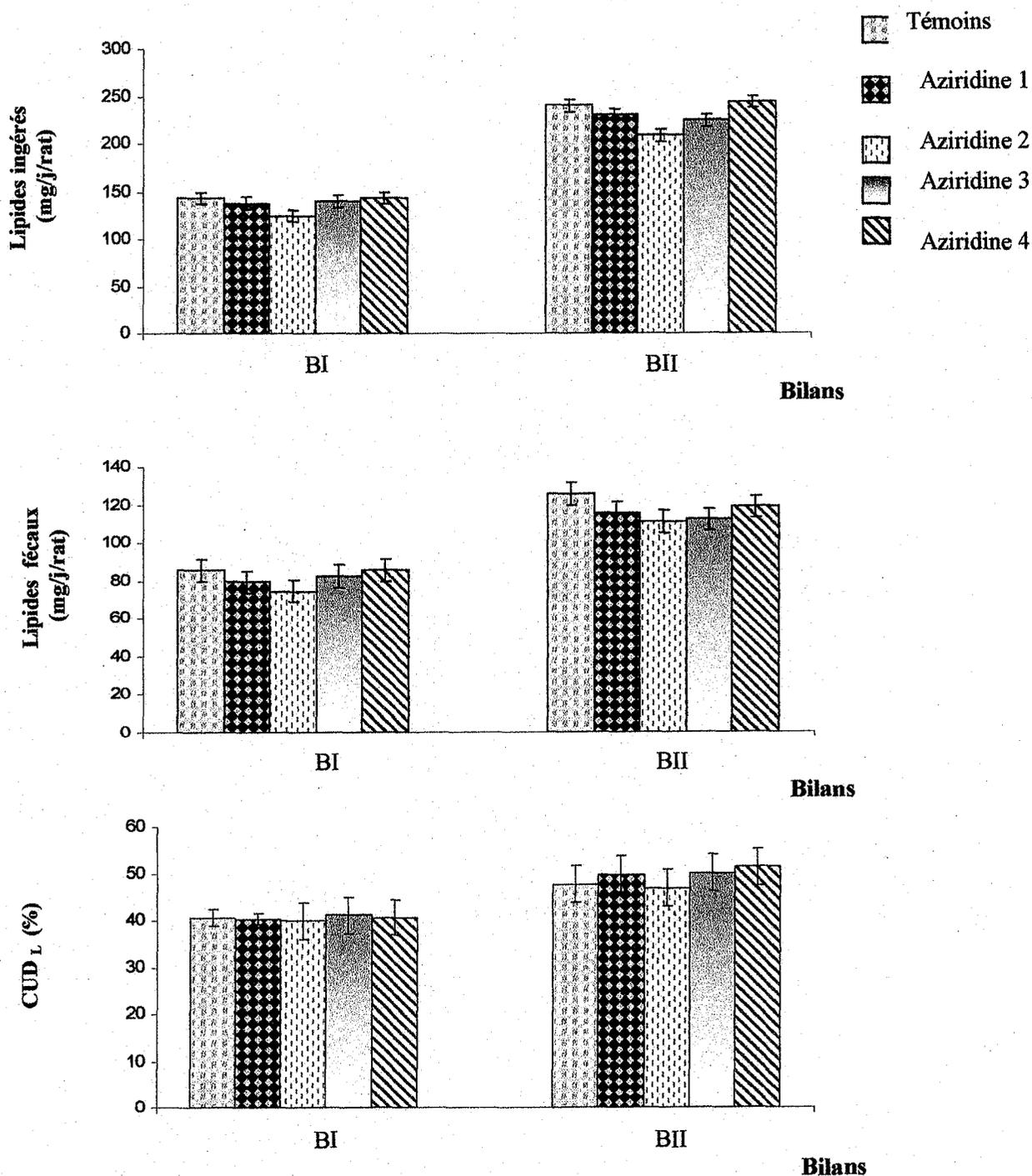


Figure 47: Lipides ingérés, lipides fécaux, et coefficient d'utilisation digestive apparente des lipides (CUD_L) chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne \pm ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

V. Effets des aziridines sur l'architecture tissulaire au niveau des organes (planches 1- 9)

Dans le but de voir si l'administration de l'aziridine s'accompagne ou non d'une altération de l'architecture tissulaire, nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau des organes (le foie, le poumon, la rate, le muscle gastrocnémien, le pancréas, le rein, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux) chez les rats témoins et chez les rats traités par l'aziridine. L'examen histologique est conçu dans le but de compléter nos résultats précédents.

Etant donné que l'aziridine 3 est la plus immunostimulante par rapport aux autres aziridines testées, selon les résultats obtenus précédemment, seule cette substance est utilisée pour étudier les effets cytotoxiques au niveau des organes cibles. De plus, seule la dose sans effet toxique observable (NOAEL, 8.75 mg/kg) est choisie pour les études histologiques afin de confirmer ou non la non toxicité réelle de cette dose et par la suite permettre ou non de la proposer pour des essais cliniques.

Au niveau du foie : L'analyse histologique au niveau du foie après coloration à l'hématoxyline-Eosine, montre une structure hépatique normale aussi bien chez les rats témoins que chez les rats traités par l'aziridine 3 à la dose NOAEL

En effet, chez les rats témoins et chez les rats traités par l'aziridine 3, les hépatocytes qui sont des cellules spécifiques du foie, ont l'aspect des cellules volumineuse, possédant un ou deux noyaux, un nucléole volumineux, un cytoplasme éosinophile (mitochondries) et granuleux (richesse en organites) dont les plages claires sont l'emplacement du glycogène (planche 1).

Au niveau du poumon : Comparés aux rats témoins, l'injection de l'aziridine aux rats expérimentaux n'induit aucune altération tissulaire des poumons, avec une taille normale des pneumocytes (**planche 2**).

Au niveau de la rate : l'observation microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau de la rate des rats témoins et des rats expérimentaux traités par l'aziridine 3 montre un aspect normal de la pulpe rouge formée par les sinus veineux (S) et les cordons de Billroth (B), possédant un réseau de fibres de réticuline dans les mailles duquel sont dispersées diverses cellules sanguines, de très nombreuses hématies et des macrophages. La pulpe blanche qui est formé par les follicules lymphatiques n'a pas été identifiée après coloration à l'hématoxyline-Eosine (**planche 3**).

Au niveau du muscle gastrocnémien : l'étude histologique réalisée au niveau du muscle gastrocnémien révèle une architecture normale chez les témoins et chez les rats expérimentaux. Au microscope optique en coupes longitudinales, les cellules musculaires ont la forme d'un cylindre allongé, possédant plusieurs noyaux situés en périphérie de la cellule, contre sa membrane plasmique. Le cytoplasme riche en mitochondries, possède des striations indiquant la présence des disques clairs (I) et des disques sombres (A) (**planche 4**).

Au niveau du cœur : l'observation microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau du cœur des rats témoins et des rats expérimentaux traités par l'aziridine 3 montre un aspect normal des cellules myocardiques (ou cardiomyocytes) présentant des striations, plus au moins allongées de forme cylindrique mononuclées dont les extrémités présentent des bifurcations, grâce auxquelles elles entrent en

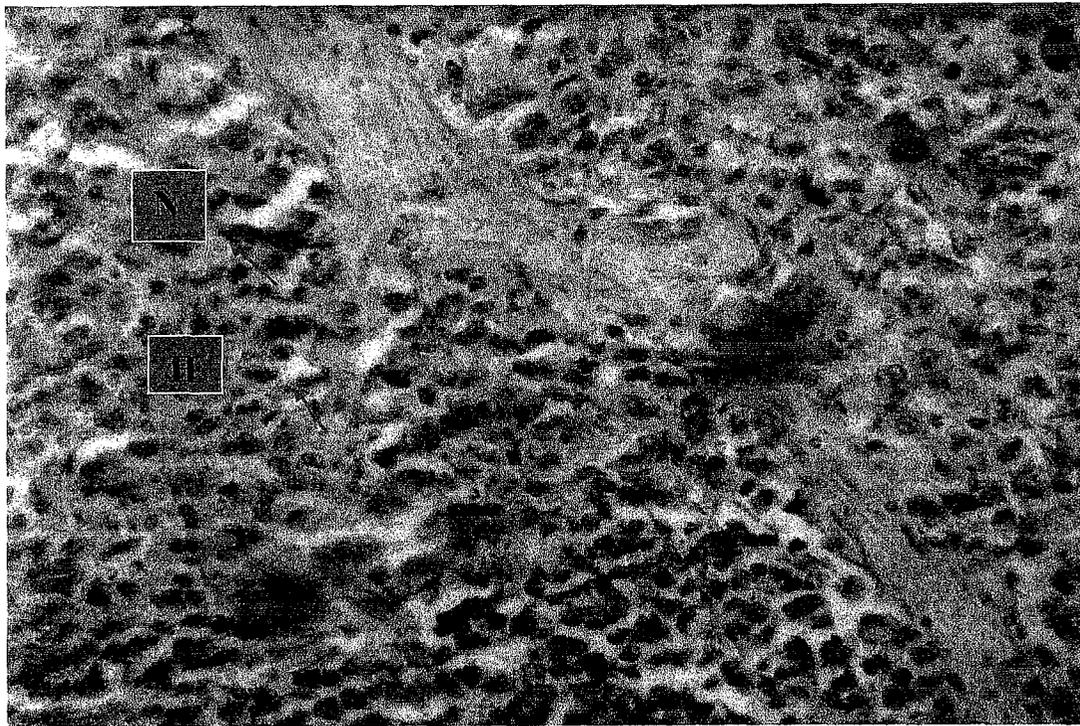
connexion avec les cellules myocardiques adjacentes pour former un réseau tridimensionnel complexe : les stries scalariformes (**planche 5**).

Au niveau du pancréas : l'étude histologique réalisée au niveau du pancréas ne révèle aucune altération du pancréas aussi bien chez les témoins que chez les rats expérimentaux. Cependant, au microscope optique, le pancréas endocrine est formé par des amas compact de cellules, les îlots de Langherhans (**I**), de formes généralement sphériques et dispersés dans le parenchyme formé par les acini exocrines (**A**). Le cytoplasme apical de chaque cellule acineuse est littéralement " gorgé " de granules de zymogène (**Z**), constituants protéiques du suc pancréatique. La base de chaque cellule comporte: un noyau arrondi avec un nucléole visible (**planche 6**).

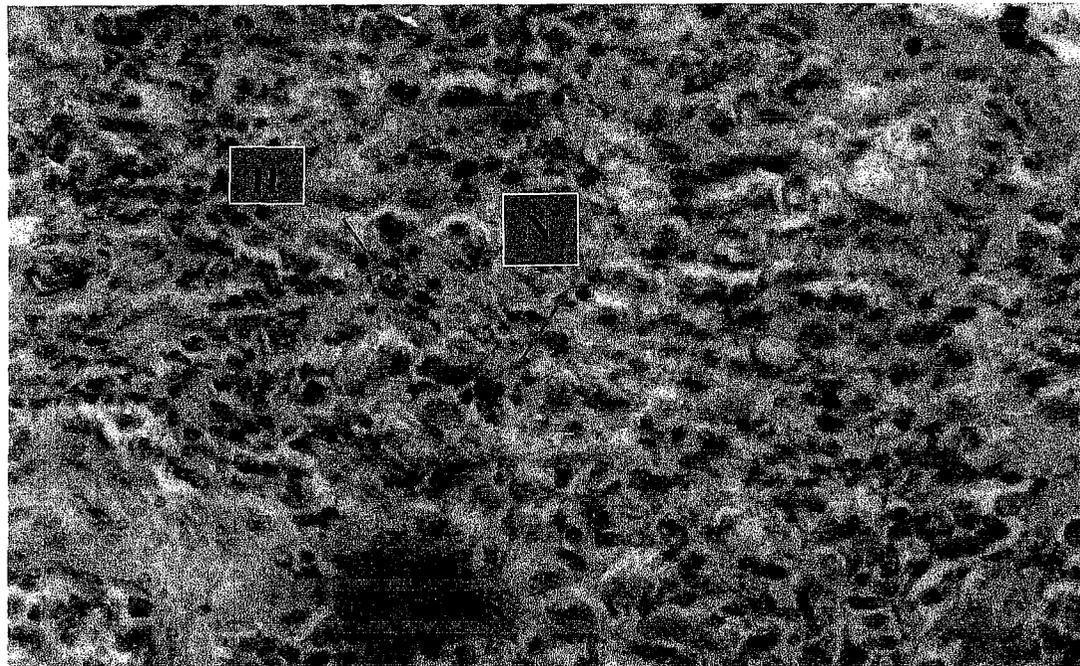
Au niveau du tissu adipeux : chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux, l'analyse des coupes histologiques ne montre aucune altération des adipocytes. Au microscope optique, les adipocytes sont des cellules sphériques. Leur cytoplasme renferme une volumineuse vacuole lipidique unique (triglycérides), entourée par une mince couronne cytoplasmique avec un noyau aplati refoulé contre la membrane plasmique (**planche 7**).

Au niveau du rein : l'examen histologique des reins, chez les rats témoins et chez les rats traités par l'aziridine 3, ne montre aucune altération structurale de la zone corticale et de la médullaire qui sont constituées par l'ensemble des néphrons et du tissu interstitiel du rein. (**Planche 8**).

Au niveau du cerveau : l'examen histologique du cerveau, ne révèle aucune altération structurale du cerveau chez les rats témoins et chez les rats traités par l'aziridine 3 (**Planche 9**).

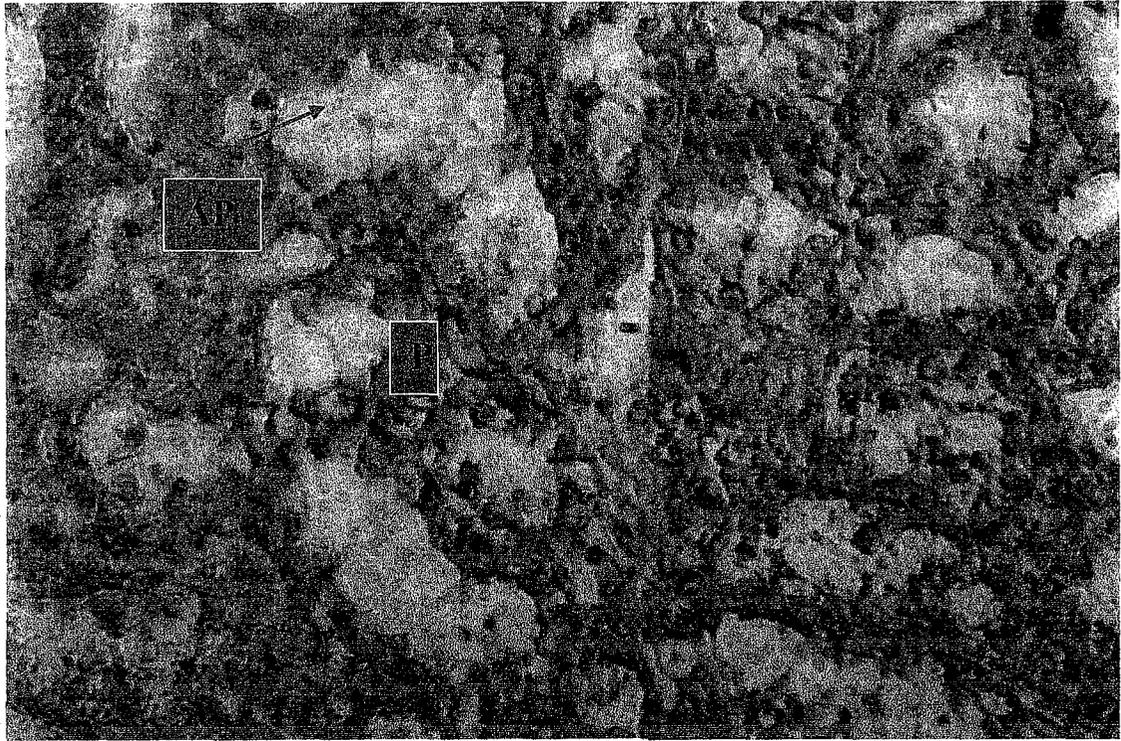


A

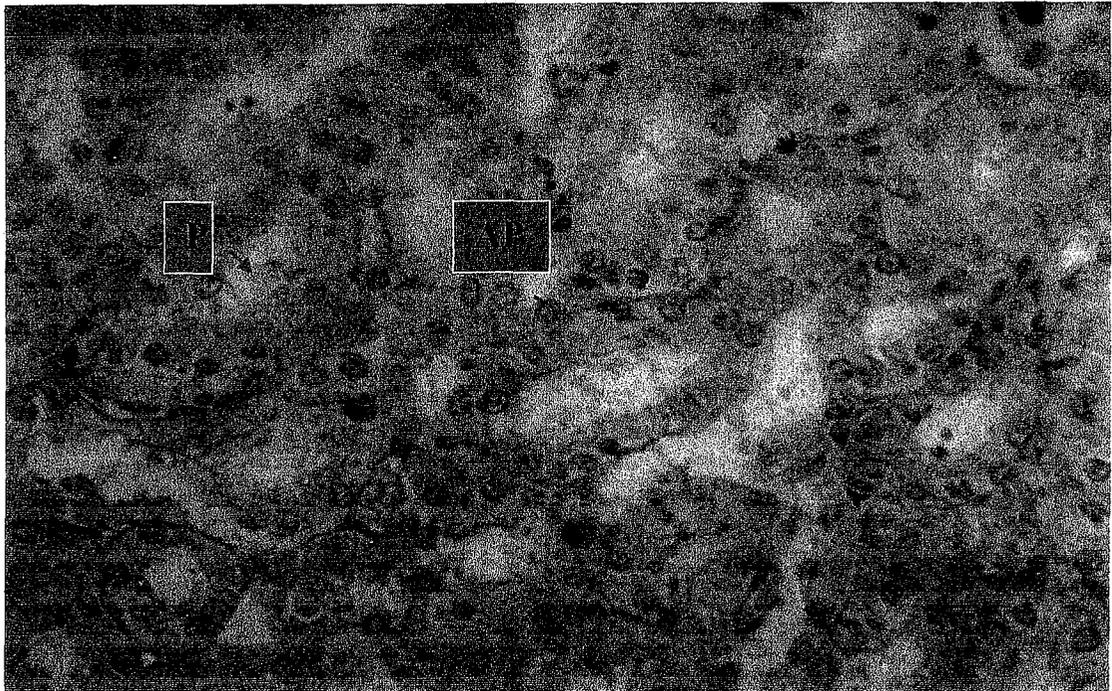


B

Planche 1 : Coupes histologiques de foie de Rat témoin (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (8.75 mg/kg) (B). Les foies sont prélevés et fixés dans le liquide de BOUIN puis inclus dans la paraffine. Les sections déparaffinées de 4 à 5 µm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Grossissement : x 40 H : hépatocyte ; N : noyau.



A

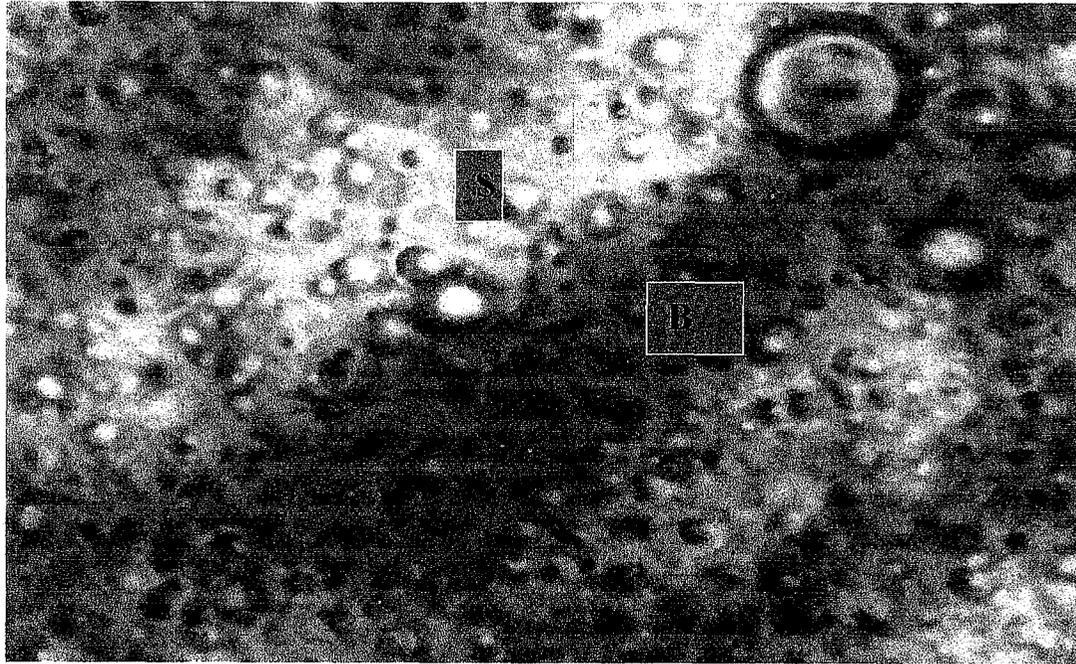


B

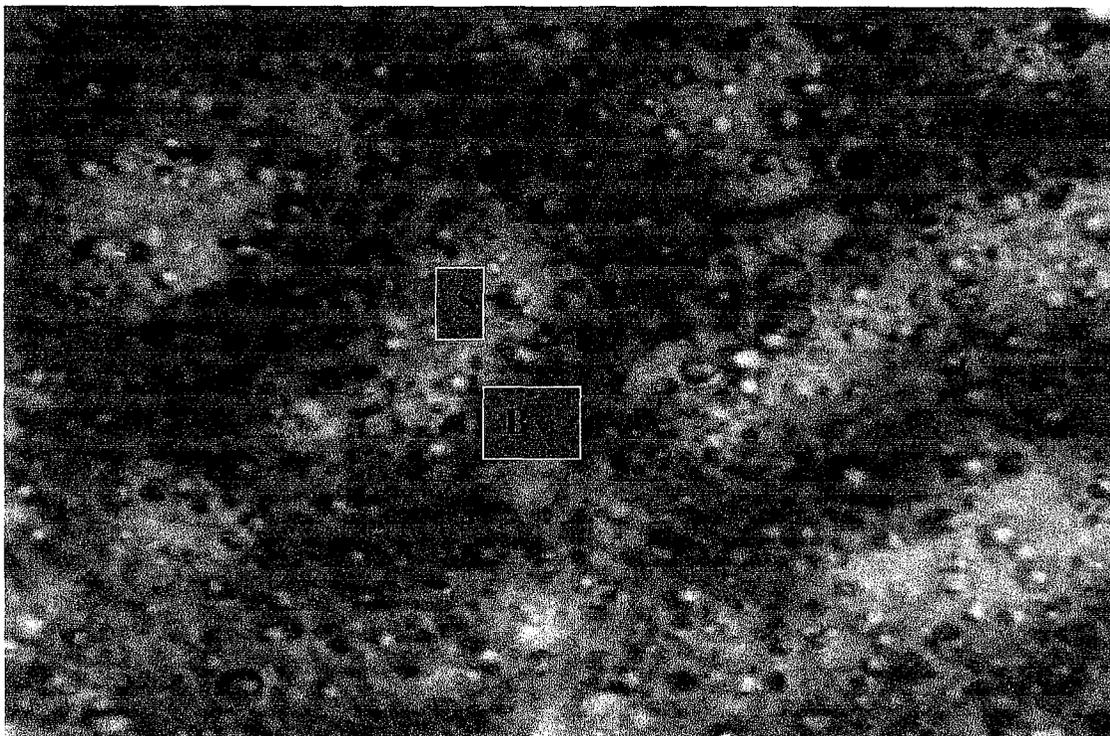
Planche 2 : Coupes histologiques de poumon de Rat témoin (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (8.75 mg/kg) (B).

Les poumons sont prélevés et fixés dans le liquide de BOUIN puis inclus dans la paraffine. Les sections déparaffinées de 4 à 5 μm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Grossissement : x 40 AP : Alvéole pulmonaire, P : Pneumocyte

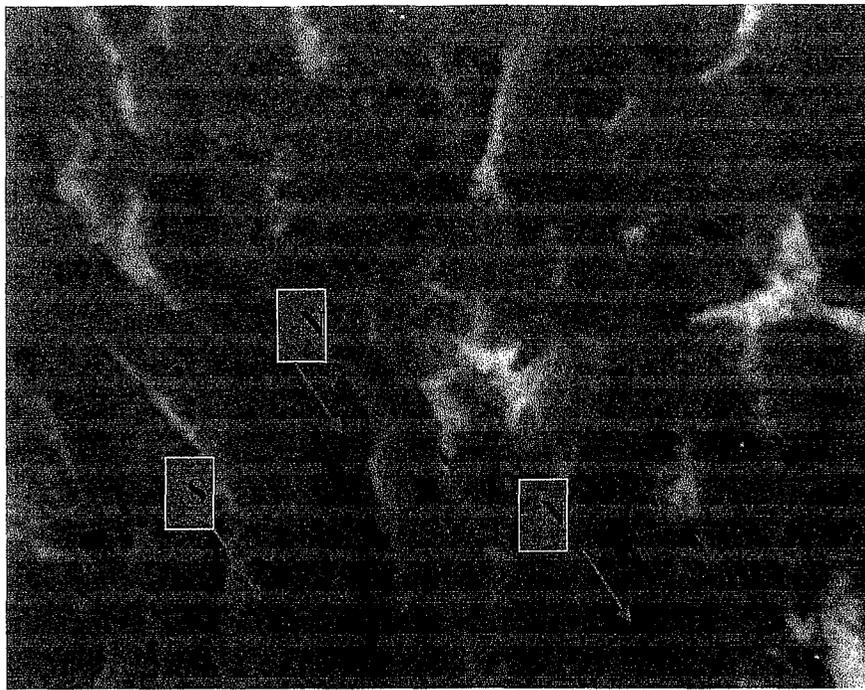


A

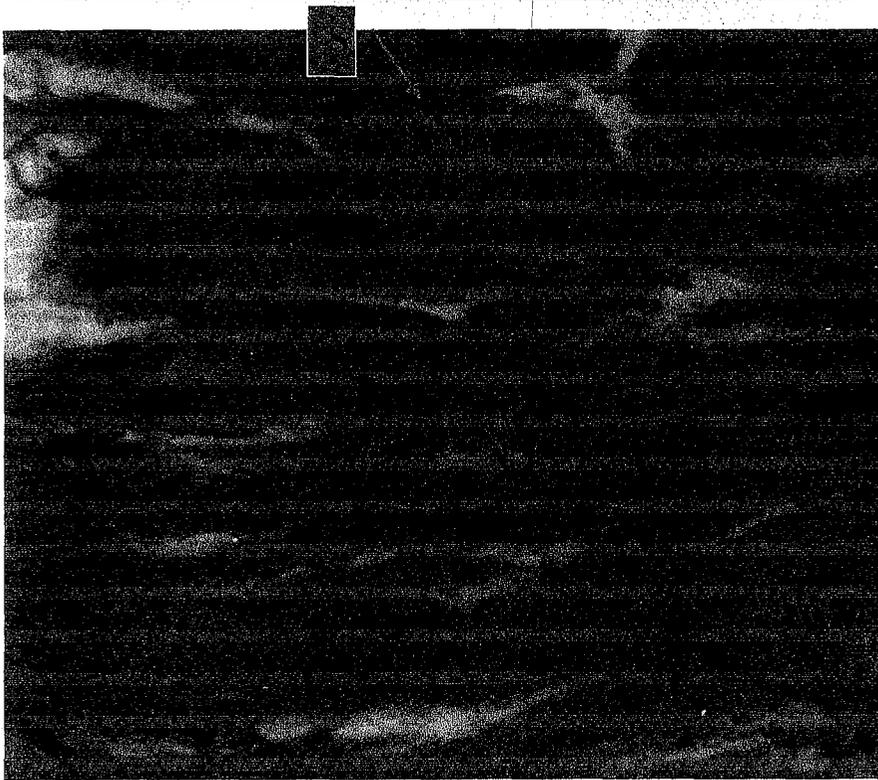


B

Planche 3 : Coupes histologiques de rate de rat témoin (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (8.75 mg/kg) (B). Les rates sont prélevées et fixées dans le liquide de BOUIN puis inclus dans la paraffine. Les sections déparaffinées de 4 à 5 µm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Grossissement : x 40 Sinus veineux de la rate (S) entouré des cordons de Billroth (B).



A

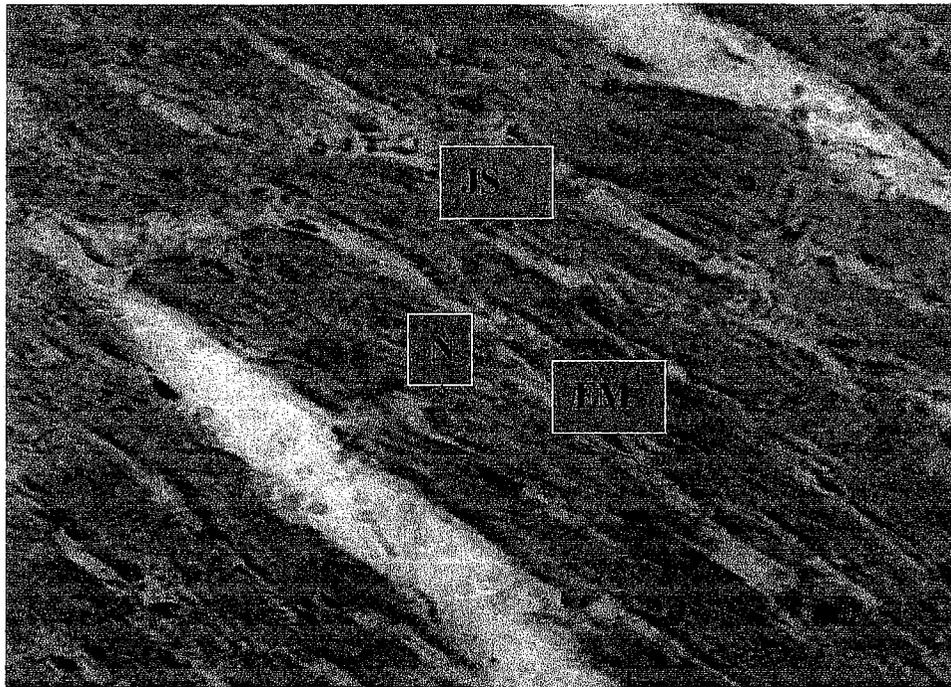


B

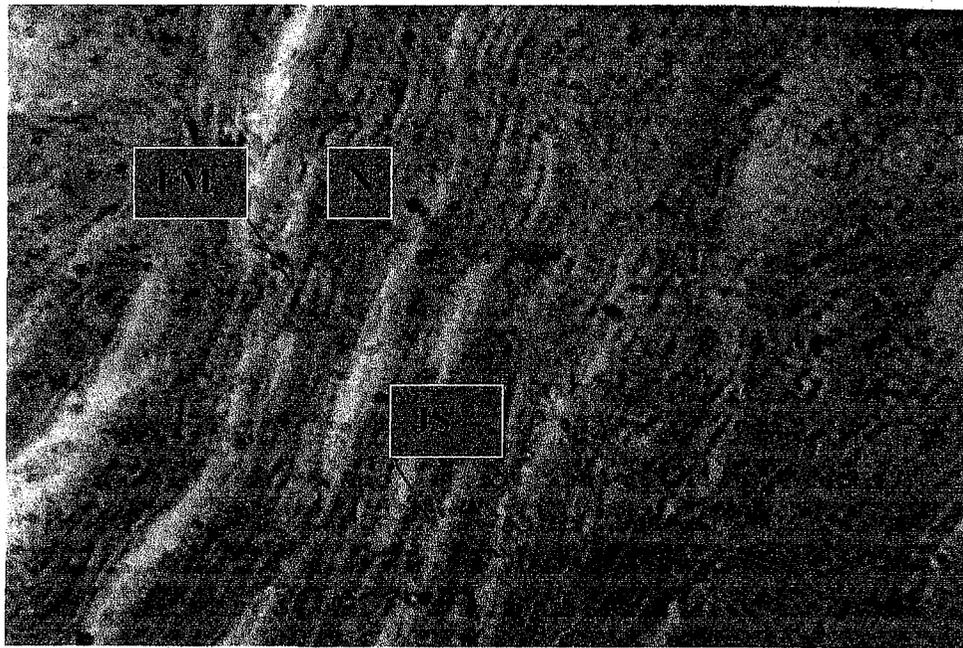
Planche 4 : Coupes histologiques du muscle gastrocnémien de Rat témoin (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (8.75 mg/kg) (B).

Les muscle gastrocnémien sont prélevés et fixés dans le liquide de BOUIN puis inclus dans la paraffine. Les sections déparaffinées de 4 à 5 μm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Grossissement : x 40 S : striations, N : noyau.

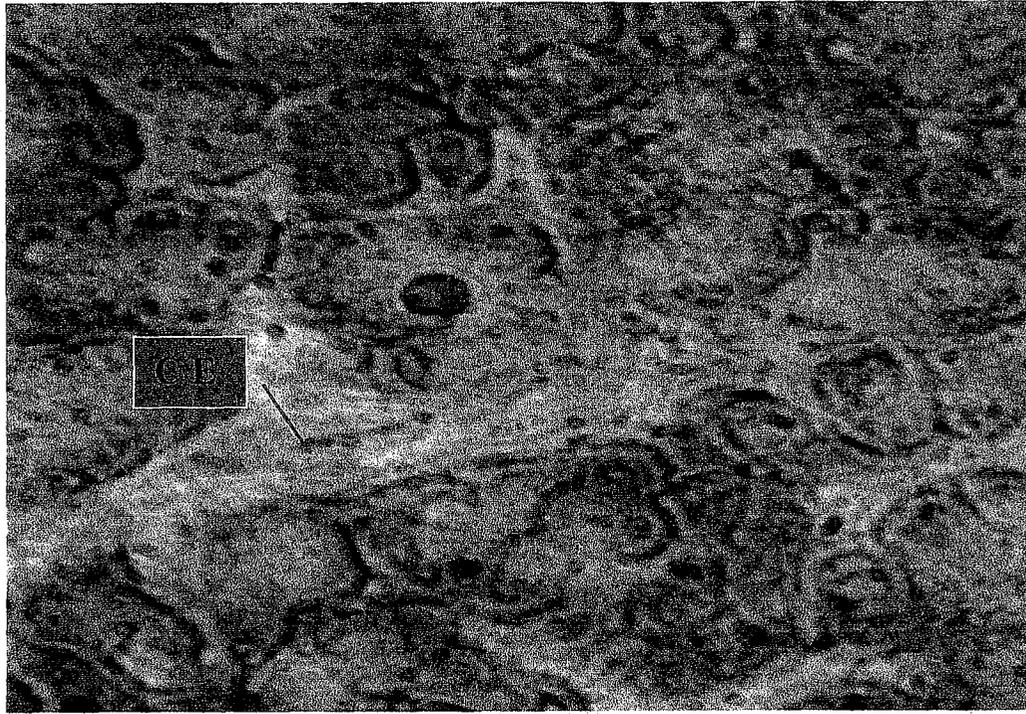


A

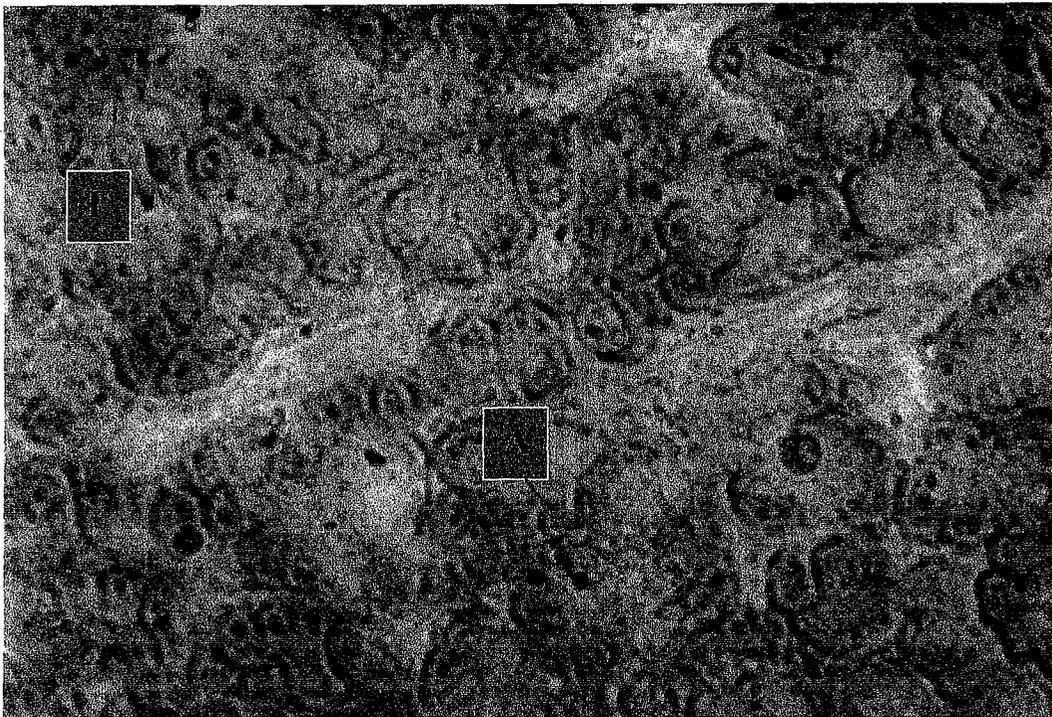


B

Planche 5 : Coupes histologiques de cœur de Rat témoin (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (8.75 mg/kg) (B). Les cœurs sont prélevés et fixés dans le liquide de BOUIN puis inclus dans la paraffine. Les sections déparaffinées de 4 à 5 µm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Grossissement : x 40 JS : jonction scalariforme, N : noyau, FM : fibre musculaire



A

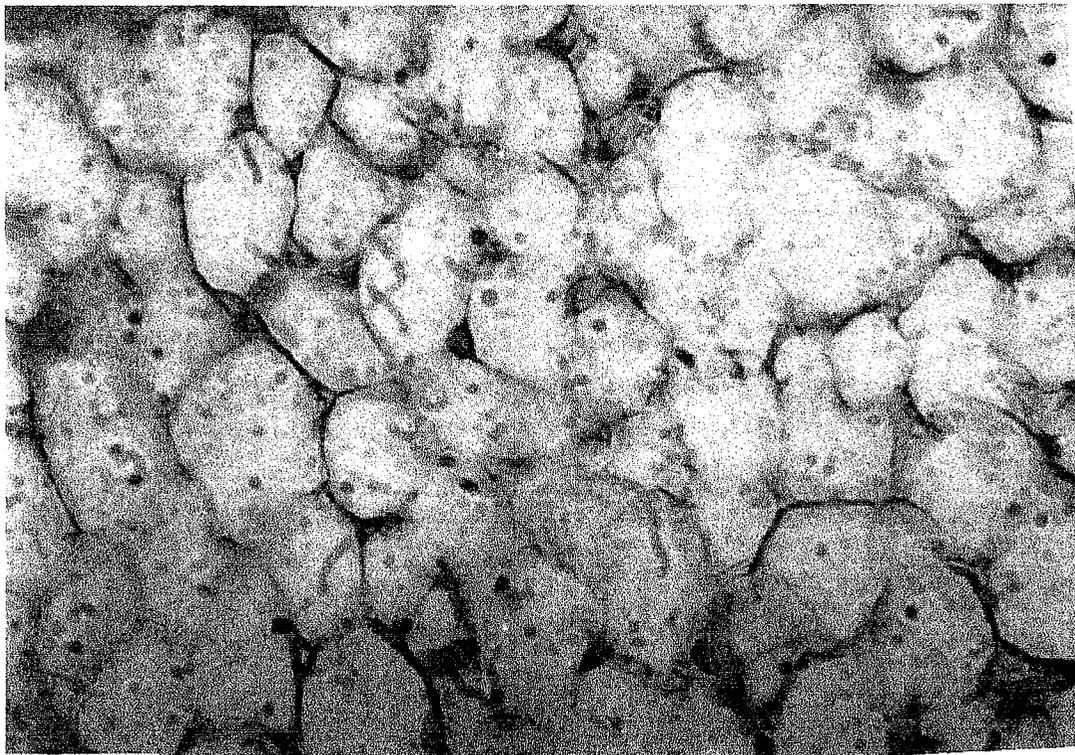


B

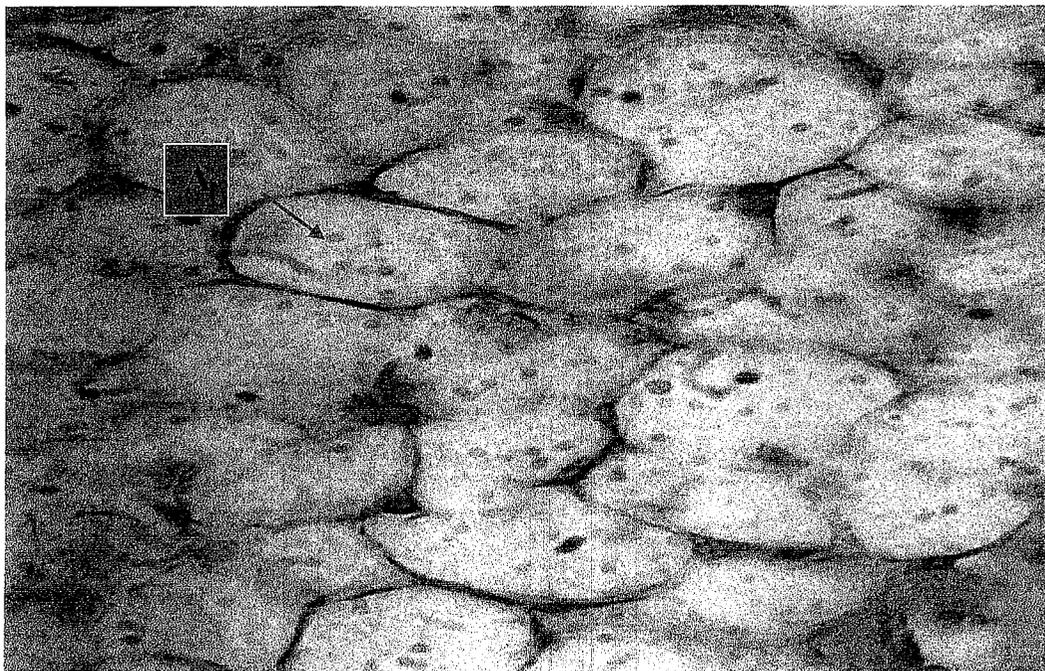
Planche 6 : Coupes histologiques de pancréas de Rat témoin (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (8.75 mg/kg) (B).

Les pancréas sont prélevés et fixés dans le liquide de BOUIN puis inclus dans la paraffine. Les sections déparaffinées de 4 à 5 μm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Grossissement : x 40 CE : canal excréteur, A : acini sécrétant le zymogène, I : Îlots de Langerhans



A

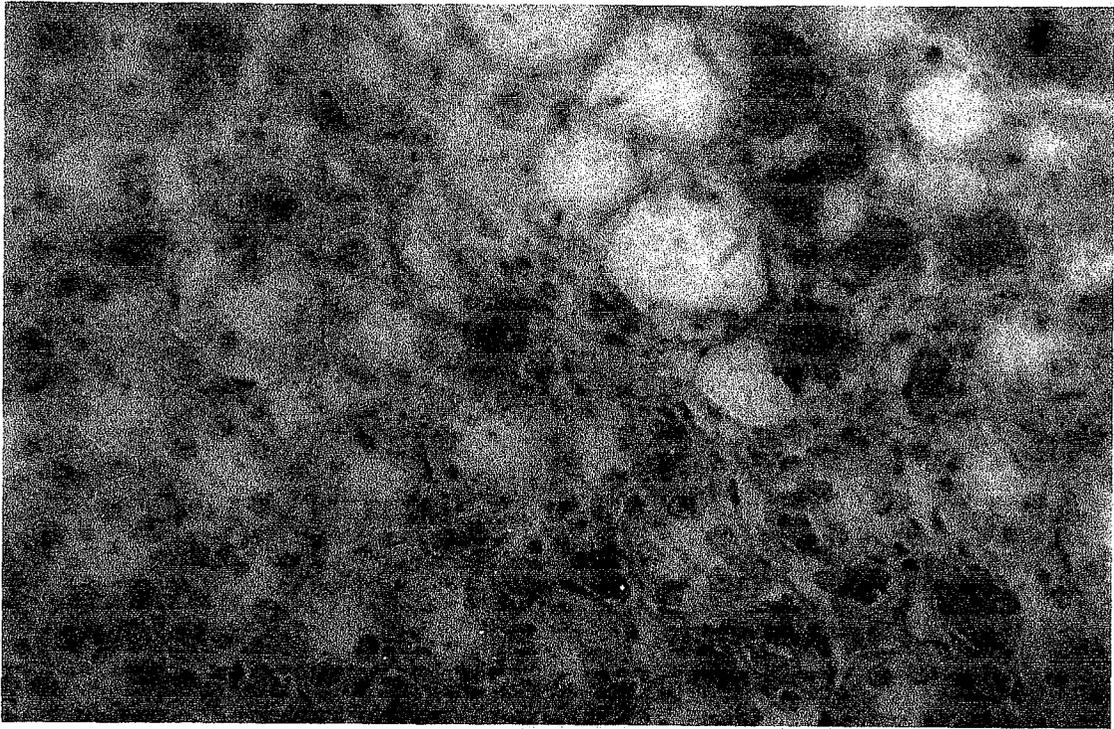


B

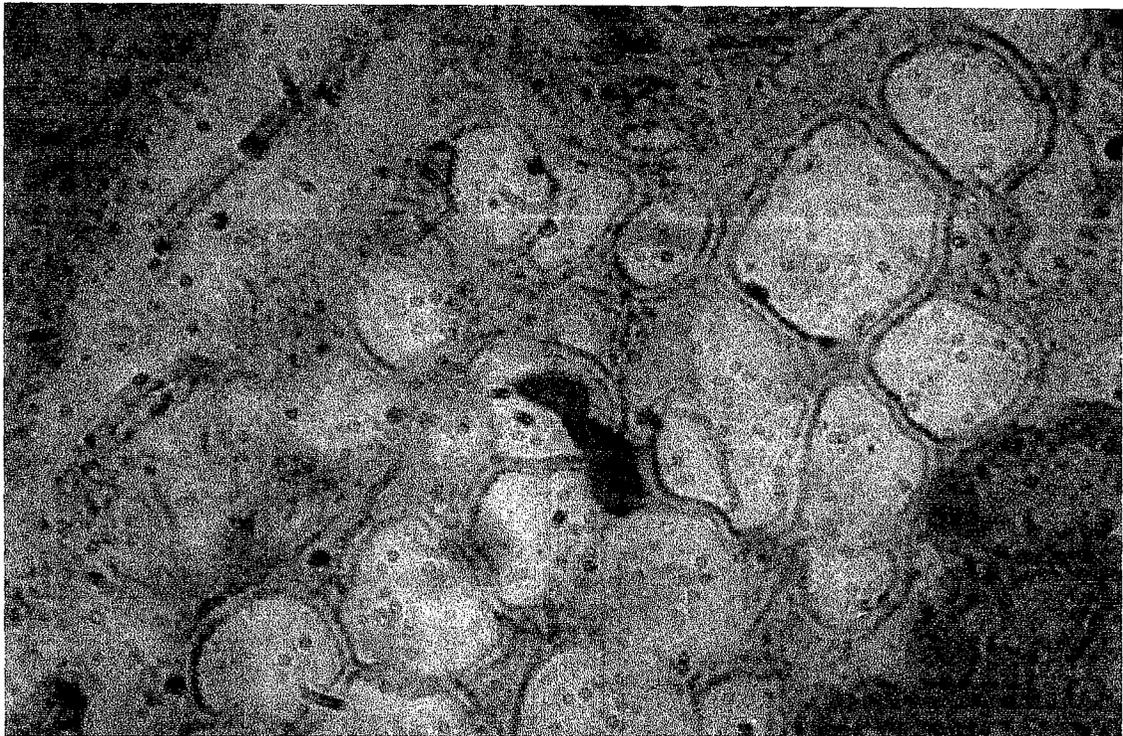
Planche 7 : Coupes histologiques du tissu adipeux de Rat témoin (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (8.75 mg/kg) (B).

Les tissus adipeux sont prélevés et fixés dans le liquide de BOUIN puis inclus dans la paraffine. Les sections déparaffinées de 4 à 5 μm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Grossissement : x 40 A : adipocyte avec noyau



A

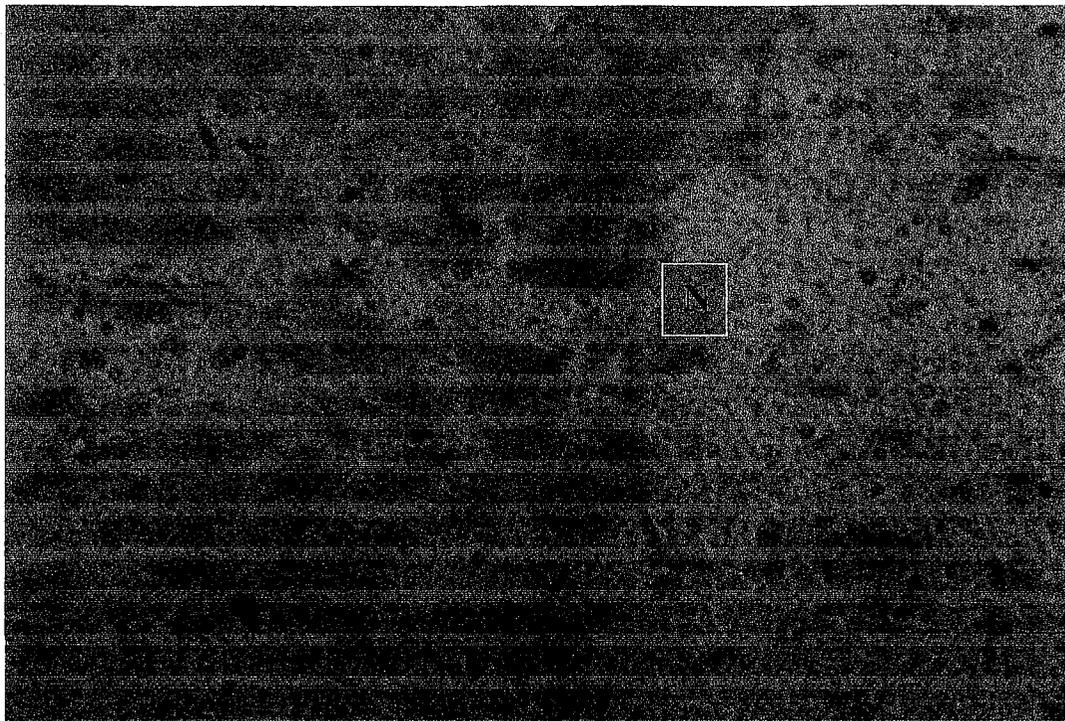


B

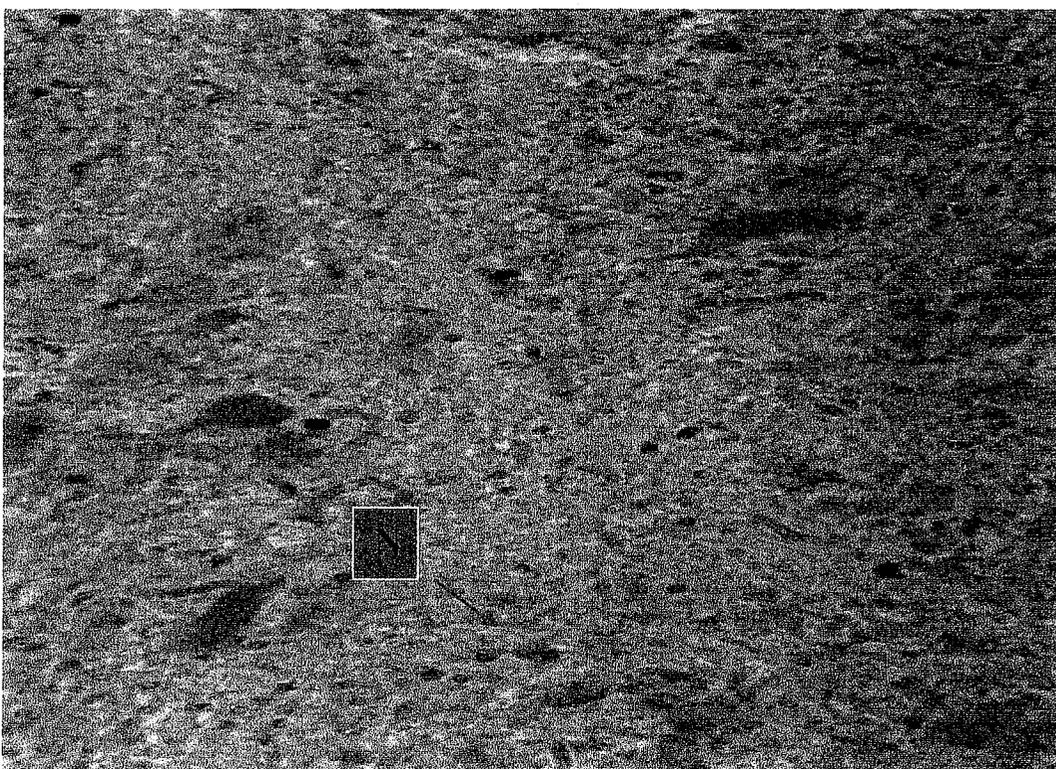
Pianche 8 : Coupes histologiques de rein de Rat témoin (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (8.75 mg/kg) (B).

Les reins sont prélevés et fixés dans le liquide de BOUIN puis inclus dans la paraffine. Les sections déparaffinées de 4 à 5 μm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Grossissement : x 40



A



B

Planche 9 : Coupes histologiques de cerveau de Rat témoin (A) et expérimentaux recevant une dose d'aziridine 3 sans effet toxique NOAEL (8.75 mg/kg) (B).

Les cerveaux sont prélevés et fixés dans le liquide de BOUIN puis inclus dans la paraffine. Les sections déparaffinées de 4 à 5 μm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Grossissement : x 40 N : neurones.

DISCUSSION

DISCUSSION

Cette dernière décennie, le cancer est devenu un problème majeur de santé publique, en particulier dans les pays développés. Il constitue la première cause de mortalité chez les hommes et chez les femmes, après les maladies cardiovasculaires (Martinelli et al., 2007 ; Krieger et al., 2008 ; Marur et al., 2008 ; Navrozoglou et al., 2008). Actuellement différents types de traitements anticancéreux constitués principalement par la chirurgie, la radiothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie sont utilisés (Lissoni et al., 2004 ; Lissoni et al., 2006 ; Menard et al., 2008).

Les connaissances actuelles sur les pathologies tumorales incitent à envisager des solutions thérapeutiques multiples et complémentaires pour tenter d'entraver le déroulement de la maladie. La découverte de nouveaux agents anticancéreux présente donc un intérêt majeur. Les agents anticancéreux se caractérisent par leurs propriétés cytotoxiques. Ils provoquent la mort des cellules, par interaction avec l'ADN ou avec le fuseau mitotique. Ces agents anticancéreux sont classés suivant leur mécanisme d'action : les intercalants, les antimétabolites comme les antifolates et les antipirimidines, des inhibiteurs des topoisomérases comme les analogues de la camptothécine et les anthracyclines et des agents alkylants comme les moutardes azotés, les aziridines et les hydrazines (Fabien et al., 2003).

Le travail présenté dans cette étude s'inscrit dans le contexte des nouvelles approches thérapeutiques anti-cancéreuses, dont l'objectif est d'inhiber la progression tumorale en faisant obstacle aux processus physiologiques associés à la biologie des tumeurs.

Les aziridines sont des agents alkylants anti-tumoraux (Huang et al., 2004 ; Vainchtein et al., 2007). Leurs activités thérapeutiques ont été décrites pendant plus d'une décennie. En raison de la présence d'un anneau hétérocycle, les aziridines ont montré une grande réactivité vis-à-vis des composés nucléophiles et électrophiles (Kiss et al.,

(Kiss et al., 2007). Les aziridines représentent des agents chimiothérapeutiques d'un grand intérêt dont les activités anticancéreuses et antibiotiques sont largement démontrées (Reynolds, 1995 ; Papaioannou et al., 2001; Marchini et al., 2001 ; Biesma et al., 2007). Afin de contribuer à la mise en évidence de l'intérêt et de l'importance de l'utilisation des aziridines au cours de l'immunothérapie, quatre nouvelles aziridines différentes par le radical R, sont synthétisées, au niveau du laboratoire COSNA (Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses) de la faculté des Sciences (Université de Tlemcen), à partir d'acides aminés (glycine pour l'aziridine 1, alanine pour l'aziridine 2, phénylalanine pour l'aziridine 3 et Tryptophane pour l'aziridine 4) (Medjahed et al., 2004). Notre étude a été réalisée en trois étapes consécutives et complémentaires :

- Dans la première étape, nous avons vérifié que les quatre nouvelles aziridines synthétisées dans le laboratoire COSNA sont réellement des substances alkylantes à l'ADN.

- Dans la deuxième étape, nous avons déterminé les effets *in vitro* de ces aziridines de synthèse sur la prolifération des lymphocytes humains stimulés par les agents mitogènes. Ces lymphocytes sont isolés de personnes témoins en bonne santé et de patientes atteintes de cancer du sein, en raison de sa fréquence élevée au niveau de l'hôpital de Tlemcen.

- En dernier, nous avons mis en évidence les effets *in vivo* des aziridines chez le rat Wistar, animal de laboratoire choisi pour les essais toxicologiques.

Nos résultats montrent que les quatre aziridines testées dans notre laboratoire, sont des agents alkylants de l'ADN. Ceci est détecté par l'électrophorèse sur gel d'agarose en milieu alcalin, révélée par un marqueur spécifique le bleu de Nile, montrant ainsi une

réduction marquée de la mobilité électrophorétique de l'ADN par rapport aux cellules incubées en absence d'aziridines. Ceci est confirmé par le test des comètes montrant un ADN intact sous forme d'une sphère en absence d'aziridine, alors qu'en présence de l'aziridine, le noyau est endommagé formant une queue de comète traduisant une toxicité vis-à-vis de l'ADN. Cet effet d'alkylation de l'ADN est en accord avec l'interaction ADN-drogue observée avec d'autres aziridines (Di Francesco et al., 2000 ; Vedejs et al., 2003 ; Warner et al., 2007).

De nombreuses études ont également démontré l'alkylation de l'ADN avec les aziridines qui sont donc largement utilisées dans le traitement du cancer (Humayou et al., 1975 ; Musser et al., 1992 ; Remers et al., 1995 ; Li et al., 1997 ; Schirmeister, 1999 ; Voloshchuk et al., 1999 ; Le pla et al., 2005).

L'utilisation des aziridines devient de plus en plus importante dans le traitement anticancéreux. De plus, plusieurs auteurs ont démontré que les aziridines possèdent une activité immunotropique marquée (Kowalczyk-Bronisz et al., 1986 ; Hanessian et al., 2000). Les aziridines modulent les deux systèmes immunitaires aussi bien humoraux que cellulaires. Ainsi, certains travaux ultérieurs ont montré que les aziridines sont immunostimulantes (Bicker, 1978). En effet, elles provoquent une augmentation spontanée de la concentration des lymphocytes T chez les patients cancéreux et modulent le système immunitaire chez les animaux (Bicker, 1978 ; Srikrishnan, 1990). D'autres chercheurs ont également montré, que les aziridines peuvent être des molécules immunodépressives induisant un déficit immunitaire (Baier et al., 1991).

Cependant, l'activité immunomodulatrice des nouvelles aziridines testées dans notre étude n'a pas été documentée précédemment, bien que les propriétés immunologiques

d'autres aziridines ont été décrites dans la littérature (Kowalczyk-Bronisz et al., 1986 ; Hanessian et al., 2000) et couvrent un vaste champ d'utilisation dans le traitement des maladies liées aux dysfonctionnements du système immunitaire.

Afin d'explorer l'activité biologique des nouvelles aziridines testées dans notre étude, nous avons isolés les lymphocytes des personnes témoins et de personnes atteintes de cancer du sein, en raison du nombre de cas élevé (OMS, 2006), et en raison des anomalies immunitaires qui lui sont associées.

Le cancer du sein est une prolifération anormale des cellules dans la glande mammaire. C'est le plus souvent un carcinome né de l'épithélium des glandes proprement dites ou de leur canaux (Balicki, 2007 ; Heiney et al., 2007 ; Fujino et al., 2008). Dans tous les cas, les perturbations immunologiques associées sont nombreuses et variées.

Les résultats obtenus à la suite du frottis sanguin colorés au May- Grunwald- Giemsa, montrent au microscope optique une morphologie cellulaire normale des leucocytes notamment les lymphocytes et les polynucléaires aussi bien chez les patientes porteuses de cancer du sein, que chez les femmes témoins. De plus les femmes cancéreuses sont caractérisées par une baisse des leucocytes. D'autres auteurs ont montré la réduction du nombre des globules blancs au cours d'un cancer du sein (Hryniuk et al., 1984 ; Bay et al., 2001).

La principale fonction touchée est l'immunité cellulaire, avec une diminution du nombre de lymphocytes T, alors que les lymphocytes B restent normaux. Le rapport CD4/CD8 chute en raison d'une plus forte diminution des CD4 +, surtout impliqués dans l'activation, par rapport aux CD8 +, essentiellement cytotoxiques. Les différents

tests d'exploration in vitro de la fonction lymphocytaire T sont perturbés, en particulier la production des cytokines, qui est diminuée (Blidaru et al., 1998).

Plusieurs études ont montré que la réduction du taux des globules blancs en particulier les lymphocytes T est à l'origine de perturbations des sous populations lymphocytaires majoritaires. En effet, les lymphocytes CD8 sont augmentés et les lymphocytes CD4 sont diminués réduisant la sécrétion des cytokines, en particulier l'IL-2 (Blidaru et al., 1998). Le signal de transduction est également diminué, ainsi que les transferts de calcium membranaire entraînant ainsi des défauts de communication lymphocytes T/cellules présentatrices d'antigène (Alam et al., 1993 ; Cantrell et al., 1996 ; Murta et al., 2000 ; Bower et al., 2003 ; Rey et al., 2005).

Steingrims-dottir et ses collaborateurs (2000) montrent qu'une greffe des cellules souches périphériques de moelle osseuse chez des individus atteints d'une maladie sanguine comme la leucémie, ou chez des patientes atteintes d'un cancer du sein permet d'augmenter les taux des lymphocytes B et T mais le rapport $CD4^+ / CD8^+$ reste faible dû à une augmentation persistante des lymphocytes CD8 et une réduction constante des lymphocytes CD4. Ceci augmente la susceptibilité de ces malades aux infections.

Les lymphocytes sont des leucocytes produits par les tissus lymphatiques et spécialisés dans la défense immunitaire de l'organisme. Il existe deux sortes de lymphocytes, les lymphocytes T responsables de l'immunité cellulaire (réponse des cellules aux antigènes) et les lymphocytes B producteurs d'anticorps, donc associés à l'immunité humorale (déclenchement des sécrétions des différentes cytokines) (Koskinen et al., 2007 ; Gupta et al., 2007 ; Chan et al., 2008 ; Levine, 2008). Les

lymphocytes sont facilement isolés du sang et sont utilisés in vitro en culture pour tester les effets immunomodulateurs de différentes substances chimiques.

Nos résultats montrent que les quatre nouvelles aziridines, aziridine 1 (*N*-phtalimidoglycyl-2hydroxyméthylaziridine); aziridine 2 (*N*-phtalimidoalanyl-2-hydroxyméthylaziridine); aziridine 3 (*N*-phtalimidophénylalanyl-2-hydroxyméthylaziridine) et l'aziridine 4 (*N*-phtaloyltryptophyl-2-hydroxyméthylaziridine), aux concentrations utilisées (1µM à 1mM), possèdent in vitro un effet immunomodulateur important sur les cellules à médiation cellulaire et humorale. Dans notre étude, l'aziridine 1, 3, 4 stimulent de manière significative la prolifération basale des lymphocytes T et B d'une façon dose- dépendante, exprimée en nombre de cellules par puit d'incubation, par l'indice de prolifération IP et par le contenu en protéines totales. Cependant, l'aziridine 2 n'a aucun effet sur la prolifération basale des lymphocytes en l'absence des mitogènes, à n'importe quelle concentration utilisée.

D'autre part, nous avons déterminé, les effets des quatre aziridines sur la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B stimulés par leurs mitogènes respectifs (Con A et LPS). La présence du mitogène stimule considérablement la prolifération des lymphocytes T (présence de Con A) et des lymphocytes B (présence de LPS). Ceci est indiqué par l'augmentation significative du nombre de cellules, de l'indice de prolifération et des taux en protéines totales en présence des agents mitogènes. L'addition de l'aziridine 1, 3 ou 4 potentialise l'effet de la Con A et de la LPS puisqu'une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes est constatée. Nos résultats sont intéressants et originaux (Baba Ahmed et al., 2006 ; 2008).

Plusieurs études expérimentales conduites chez l'animal et l'homme in vitro, rapportent que la ConA et la LPS activent la prolifération cellulaire des lymphocytes. Cette activation est déclenchée par des transductions de signaux via la membrane cellulaire. Il s'agit d'un processus général dans lequel une molécule de ligand s'accroche à son site récepteur sur la surface cellulaire et déclenche une cascade d'événements biochimiques dans la membrane cellulaire. Ces événements initient une activation enzymatique, une activation de gènes, ce qui aboutit finalement à la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines, à la prolifération cellulaire et à un processus de multiplication clonale de lymphocytes-T (Iyer et al., 1984 ; Cassatella et al., 1989 ; Lewis et al., 1989 ; Altman et al., 1990 ; Niks et al., 1990 ; Liburdy, 1994 ; Brenner et al., 1997 ; Ferreira et al., 2003 ; Koide et al., 2006 ; Fagone et al., 2007 ; Jiang et al., 2007 ; Nakano et al., 2007 ; Mueller et al., 2008).

Dans notre étude, les aziridines 1, 3 et 4 provoquent une augmentation du nombre de cellules, de l'indice de prolifération et des teneurs en protéines totales des lymphocytes B et T, en absence et en présence des agents mitogènes, chez les femmes atteintes du cancer du sein, suggérant que ces aziridines sont potentiellement immunostimulantes aussi bien sur les lymphocytes témoins que sur les lymphocytes isolés d'une personne cancéreuse. De la même façon, l'aziridine 2 est immunosuppressive sur les deux types de lymphocytes.

L'interleukine-2 (IL-2) est un facteur important de maturation et de croissance des lymphocytes T. Elle active leur transformation en lymphocytes T cytotoxiques de type CD8⁺ qui sécrètent l'interféron g, lequel stimule les macrophages à libérer le TNF α et le TGF b (transforming growth factor b) (Cantrell et al., 1984 ; Kamimura et al., 2007 ; Fuse et al., 2008). L'interleukine-6 (IL-6), une autre cytokine, joue un rôle

significatif dans la prolifération et la différenciation des cellules B (Reickmann et al., 1991 ; Okamoto et al., 2007 ; Koshiba et al., 2008).

La quantification des IL-2 et des IL-6 indique que la stimulation de la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B, par leurs mitogènes respectifs, est associée à une production plus importante des IL-2 et des IL-6. Le premier événement lors de l'activation est la liaison du récepteur de l'agent mitogène avec le domaine extracellulaire du récepteur du lymphocyte (TCR pour les lymphocytes T et BCR pour les lymphocytes B). Ceci s'accompagne de modifications des taux intralymphocytaires d'AMP cyclique, d'adényl cyclase, et de GMP cyclique, provoquant une augmentation de l'influx calcique suivi d'une phosphorylation, induisant ainsi l'activation des gènes contrôlant la synthèse des interleukines et la prolifération clonale des lymphocytes (Kato et al., 2007).

Nos résultats montrent que la prolifération in vitro des lymphocytes T et des lymphocytes B en absence des mitogènes est réduite suite à la diminution de la production des IL-2 et IL-6 chez les femmes cancéreuses. D'après certains auteurs, il existe chez ces femmes cancéreuses des déficits complexes de l'immunité qui touchent les fonctions et l'activation des lymphocytes accompagnés d'une diminution de la capacité de la production des interleukines d'IL-2 (Brenner et al., 1997 ; Bouet-Toussaint et al., 2000 ; Steingrims-dottir et al., 2000 ; Hadden, 2003). Ce déficit immunitaire est dû selon ces auteurs à un défaut d'activation des cellules T, et de certains ionophores calciques permettant ainsi de déclencher un flux calcique. Ceci implique un défaut de couplage des récepteurs membranaires entraînant par la suite un défaut de production d'IL2 et d'autres cytokines.

Dans notre étude, l'aziridine 1, l'aziridine 3 et l'aziridine 4 augmentent significativement la sécrétion des IL-2 et IL-6, l'effet étant dose dépendant aussi bien chez les témoins que chez les femmes cancéreuses. Les mécanismes par lesquels la prolifération des lymphocytes et la production des interleukines sont influencées par les aziridines ne sont pas encore élucidés. Néanmoins, l'aziridine 1, 3 et 4 peuvent agir sur une étape clé de la cascade de signalisation qui mène à la prolifération et aux fonctions des lymphocytes, comme il a été observé pour d'autres agents immunostimulants (Nonnecke et al., 1991 ; Wagner et al., 1999 ; Bishop et al., 2000⁸ ; Siwicki et al., 2001 ; 2004). Il a été démontré que les changements des taux d'IL-2 sont corrélés à ceux des IL-6, et aux activités CD8+ et NK chez les patients cancéreux pendant la thérapie antitumorale (Gao et al., 2005).

D'un autre côté, l'aziridine 2 réduit la production des IL 2 et IL 6 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses, suggérant que son effet immunosuppresseur est liée à l'inhibition de la synthèse des cytokines. Cependant, l'action inhibitrice de cette nouvelle substance testée sur la prolifération lymphocytaire et la sécrétion des interleukines n'a pas été décrite précédemment dans la littérature. Il a été montré *in vitro et in vivo* que la cyclophosphamide, un dérivé des aziridines, utilisée dans le traitement des maladies auto-immunes, possède un effet inhibiteur très spécifique sur la réponse des cellules T diminuant l'immunité cellulaire. En effet, après fixation sur un récepteur intracytoplasmique, la cyclophosphamide bloque la voie d'activation calcineurine dépendante, intervenant dans la transcription et l'expression génique codant pour la sécrétion de multiples cytokines comme : l'interféron gamma, le « TNF », l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, etc. La diminution de production de cytokines a pour conséquence une réduction de la prolifération des

lymphocytes T, diminuant l'activité et l'expansion clonale des cellules CD4⁺ (lymphocytes T-helper), et de la prolifération des lymphocytes B entraînant une réduction de la synthèse d'immunoglobulines (Kuroi et al., 1994 ; Boitard et al., 1999 ; Su et al., 2006 ; Salem et al., 2007 ; Bracci et al., 2007). Dans notre étude, l'aziridine 2 testée pourrait agir comme les autres aziridines immunosuppressives.

Les membranes biologiques sont essentiellement constituées de lipides complexes dont 70 à 90 % de phospholipides. Les acides gras saturés (AGS) et les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des constituants importants des phospholipides des membranes cellulaires dont ils assurent la structure et la perméabilité (Ohvo-Rekilä et al., 2002 ; Khandelia et al., 2008). Les investigations menées dans la suite de notre étude in vitro ont visé à déterminer les effets des aziridines sur la composition en acides gras des phospholipides (PL) des membranes des lymphocytes. Pour cela, nous avons choisi l'aziridine 3 (R = PhCH₂) à une concentration de 1mM, dont l'effet immunostimulateur est le plus important, afin de poursuivre nos recherches sur les mécanismes d'action des aziridines. Notre choix est guidé par le fait que les femmes atteintes d'un cancer du sein sont immunodéficientes et que les recherches doivent donc être orientées vers les substances immunostimulantes. Selon nos résultats, une réduction des pourcentages en AGS des PL membranaires des lymphocytes incubés en présence de la Con A est notée chez les témoins et chez les femmes cancéreuses par rapport à la composition basale. Les AGMI augmentent suite à l'augmentation du C18 :1 n-9. Par contre, le rapport P/S diminue accompagné d'une diminution du C20 :4n-6, du C20 :5n-3 et du C22 :6n-3 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses, en présence de la ConA par rapport à la composition basale. Il est à noter que dans notre étude, la composition en acide gras des membranes des

lymphocytes des femmes atteintes du cancer du sein est similaire à celle chez les témoins. Cependant, plusieurs études ont noté des modifications de la composition en acide gras des membranes cellulaires au cours du cancer du sein, en particulier les AGPI de la famille n-3 et n-6 (Bougnoux, 1999 ; Bagga et al., 2002 ; Boyd et al., 2003 ; Thiébaud et al., 2005). De plus, plusieurs études montrent que les AGPI n-6 favorisent le développement tumoral, tandis que les AGPI n-3 ont un effet protecteur. Les AGPI peuvent agir sur la stimulation de la croissance tumorale en modulant la transcription de nombreux gènes (Blouin et al., 2006 ; Gerber, 2006 ; Rongère et al., 2006).

La composition des lipides neutres et des phospholipides membranaires des lymphocytes des ganglions chez le rat a été étudiée par plusieurs auteurs (Goppelt et al., 1987; Calder et al., 1991; Valette et al., 1991). Ces travaux ont montré qu'une stimulation des lymphocytes T avec la con A entraîne d'importants changements dans la composition en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes suite à la diminution de l'acide stéarique, linoléique et l'acide arachidonique accompagnée d'une augmentation de l'acide oléique. La ConA conduit à une modification de la fluidité membranaire des lymphocytes. Nos résultats vont dans le même sens que ces travaux ultérieurs puisque la ConA induit des modifications similaires de la composition en acide gras des membranes des lymphocytes. Cet effet est observé aussi chez les témoins que chez les femmes cancéreuses.

Nos résultats montrent que l'aziridine 3 n'a entraîné aucune modification des AGS, des AGPI et des AGMI des membranes des lymphocytes chez les témoins, et aussi chez les femmes cancéreuses. Il apparaît clairement que l'effet immunostimulant de l'aziridine testée n'est pas associé à des interactions aux PL membranaires comme

c'est le cas de la ConA. En effet, la prolifération des lymphocytes stimulés par la ConA est associée à un changement de la composition en phospholipides des membranes (Calder et al., 1994). Les phospholipides constituent non seulement des composants membranaires, mais constituent également une réserve importante de médiateurs biochimiques. Ce sont, en effet, les précurseurs d'une grande variété de médiateurs lipidiques : prostaglandines, leucotriènes, thromboxane, PAF-acéther, acides lysophosphatidiques et acides gras libres. Ces médiateurs lipidiques agissent comme des seconds messagers intracellulaires lors de l'activation des lymphocytes T en modulant l'activité enzymatique telle que la protéine kinase C (PKC), les canaux ioniques (calciques ou potassiques) et le facteur transcriptionnel NF-AT (un facteur essentiel à la transcription du gène de l'IL-2). La synthèse des médiateurs lipidiques est initiée d'abord par la stimulation des phospholipases A2 (PLA2). Cette enzyme hydrolyse les phospholipides membranaires, en libérant l'acide arachidonique et la phospholipase D, et en produisant le diacyl glycérol à partir de la phosphatidyl choline, étape importante lors de l'activation des lymphocytes (Khan et Hichami, 1999 ; Denys et al., 2004). L'activation de la prolifération des lymphocytes par l'aziridine testée semble être différente puisque aucune modification de la composition en acide gras des phospholipides membranaires n'est observée.

La deuxième partie de notre étude a été consacrée à l'étude in vivo visant à déterminer les effets de ces nouvelles molécules d'aziridines chez le rat Wistar, et par la suite permettre ou non de les recommander pour des essais cliniques dans le traitement des anomalies immunologiques.

Afin de garantir l'innocuité des produits destinés à l'homme dans les conditions d'emplois prévus, des études toxicologiques doivent être réalisées. Ces essais sont

réalisés sur des animaux de laboratoire, généralement sur le rat de souche « Wistar » (Wallace et al., 1990 ; Acred et al., 1994 ; Everitt et al., 1995).

Les tests de toxicité doivent être effectués conformément aux lignes directrices de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique), du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA), de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation des critères techniques relatifs à l'enregistrement des médicaments pour l'utilisation humaine (ICH), et de la FDA (Food and Drug Administration) en utilisant le moins possible d'animaux et en offrant le maximum de considération afin de soulager leur souffrance et/ou leur détresse (FDA, 1987 ; CCPA, 1993 ; Flecknell, 1994 ; Mathews, 1997 ; OCDE, 2001).

L'OCDE définit le point limite comme étant l'indicateur le plus précoce dans une expérimentation animale, de douleur physique ou mentale sévère, souffrance ou état moribond (Hamm, 1995 ; Morton, 1997). L'expression « point limite » est également définie par le CCPA, comme étant le moment auquel la souffrance et /ou la douleur d'un animal d'expérimentation est arrêtée, minimisée ou diminuée (Zimmermann, 1983 ; Wong et al., 1997).

L'étude de la mortalité après une seule administration de l'aziridine permet de déterminer la dose Létale 50 (DL50). La DL50 est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance donnée, la dose qui tue 50% des animaux traités dans un temps déterminé de 14 jours.

Parallèlement, L'OCDE déconseille l'utilisation du test DL50 classique et recommande l'utilisation d'alternatives qui réduisent l'utilisation du nombre d'animaux et utilisent comme point limite la morbidité plutôt que la mortalité (OCDE, 2001). Les recommandations du Interagency Research Animal Committee (IRAC,

1993) sur la DL50 spécifient que : le test de la DL50 classique ne devrait être effectué que lorsqu'il est spécifiquement justifié pour des exigences scientifiques et qu'il est approuvé par le comité institutionnel de protection des animaux (institutional animal care and use committee IACUC) (Morton et al., 1995). De plus, l'OCDE recommande d'administrer la substance à des animaux répartis en plusieurs groupes et ce, à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité s'échelonnant entre 0 et 100 %. Les doses administrées doivent être comprises entre 5 mg/Kg et 5 g/kg de poids corporel pour permettre de situer les substances testées sur l'échelle comparative de toxicité de substances chimiques de Hodge et Sterner (Claude, 1988 ; OCDE, 2001).

Dans notre étude, l'injection intrapéritonéale des quatre aziridines à différentes doses (dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4 ; dose 2: 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4 ; dose 3: 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4 ; dose 4: 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4 et la dose 5 : 130 mg/kg pour l'aziridine 1, 137 mg/kg pour l'aziridine 2, 175 mg/kg pour l'aziridine 3, 187 mg/kg pour l'aziridine 4), chez les rats et leur observation pendant 14 jours, a montré des effets différents selon la dose injectée. Pour l'aziridine 1, la DL50 est de 65 mg/kg puisqu'elle provoque la mort de 50 % des rats, elle est de 68.50 mg/kg pour l'aziridine 2. Concernant l'aziridine 3, la DL50 est estimée à 100 mg/kg. Elle est estimée à 104.71 mg/kg pour l'aziridine 4. Selon

l'échelle de toxicité internationale, les quatre aziridines se classent comme substances moyennement toxiques (OCDE, 2001).

Les chercheurs canadiens Morton et Griffiths (1985) et les directives de l'OCDE (2001) et du CCPA (1993) ont dégagé les grandes lignes de l'élaboration d'un ensemble d'observations pour l'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort des animaux de laboratoire en se basant sur cinq paramètres.

Le premier paramètre décrit les signes cliniques généraux. Ce sont les premiers signes que l'on peut observer chez l'animal souffrant tels que l'apparence physique, le changement du comportement, le pelage, la posture, les signes oculaires, la température rectale, les changements des rythmes cardiaque et respiratoire.

Dans notre étude, l'observation clinique est réalisée chaque jour, le matin à la même heure. Quelque soit l'aziridine injectée, la dose 1 (6.5 – 9.35 mg/kg) ne provoque aucun signe clinique chez tous les rats. L'administration de l'aziridine a provoqué chez les rats différents signes cliniques 24 heures après l'injection de doses différentes d'aziridine allant de 26 mg/kg à 37,4 mg/kg pour la dose 2, de 65 mg/kg à 93,5 mg/kg pour la dose 3, de 97,5 mg/kg à 140,25 mg/kg pour la dose 4 et de 130 mg/kg à 187 mg/kg pour la dose 5 pour l'ensemble des aziridines testées. Ces symptômes de toxicité sont caractérisés par des signes externes caractéristiques dont la sévérité augmente avec la dose injectée.

En effet, suite à l'injection, les animaux testés sont moins actifs et ont des difficultés à garder la station verticale par rapport aux rats normaux. Ceci est dû à un défaut de coordination musculaire et à des mouvements anormaux des membres accompagnés d'une respiration anormale qui se traduit par une dyspnée ou une tachypnée.

La posture anormale avec le dos courbé résulte essentiellement de la douleur provoquée par la substance injectée. Les rats testés cherchent anormalement à se tenir sur leurs membres postérieurs.

D'une façon générale, les rats normaux en bonne santé possèdent des poils lisses, propres et d'apparence bien soignée. Un manque de toilettage est un indicateur fiable de dysfonction (Morton, 2000). Dans notre étude, les rats expérimentaux présentent des poils ébouriffés (hérissés) avec une chute de poils résultant principalement d'un défaut de toilettage de l'animal. De plus, les rats expérimentaux présentent une humidité des poils entourant les lèvres, liée à une hypersalivation.

Nous avons aussi observé une hypothermie de 36° C à 37,5 °C se traduisant par des tremblements de l'ensemble du corps des animaux. L'hypothermie est d'autant plus importante que la dose d'aziridine injectée augmente. Par ailleurs, Soothill et al. (1992) et Wong et al. (1997) ont trouvé que lors d'une souffrance chez les souris et chez les rats, une hypothermie de 34 °C est prédictive de mortalité. D'après ces auteurs, le point limite dans un modèle animal est défini lorsque la température corporelle baisse de plus de 4 °C.

Nous avons noté chez les rats expérimentaux en comparaison avec les témoins, la présence de diarrhée, ainsi que du sang dans les urines et les fèces.

De plus, à la dose 5 (130 mg/kg à 187 mg/kg) pour l'ensemble des aziridines testés, nos résultats ont montré, que tous les animaux sont moribonds montrant des signes cliniques de plus en plus importants et sévères, ce qui constitue le point limite dans les tests toxicologiques.

Le deuxième paramètre étudié concerne les variations du poids de l'animal, de l'ingestion de nourriture et d'eau. Sanford et al. (1986) et Wallace et al. (1990) ont

établi qu'une perte de poids significative peut être l'un des signes de détérioration de l'état de l'animal le plus important reflétant un changement dans l'ingestion de nourriture et d'eau. Une perte de poids dans ces circonstances doit toujours être évaluée par rapport à l'animal témoin approprié.

Dans notre étude, les variations du poids corporel sont déterminées chez les rats témoins (recevant une injection d'eau physiologique) et chez les rats expérimentaux (recevant une injection d'aziridine testée) et sont notées quotidiennement le matin à la même heure au cours de la période d'expérimentation. Nos résultats montrent qu'au début de l'expérimentation, les différents lots de rats ont des poids homogènes, variant de 196 à 210 g. Les rats témoins montrent une croissance normale avec un gain moyen quotidien de 30 % durant la première semaine et de 23 % durant la deuxième semaine d'observation. Quelque soit l'aziridine testée, l'injection de la première dose (6.5 - 9.35 mg/kg) ne provoque pas de variations significatives du poids corporel des rats expérimentaux comparés aux témoins durant la première et la deuxième semaine d'expérimentation. En effet, ces rats expérimentaux montrent un gain pondéral moyen allant de 25 % à 30 % durant la première semaine et de 15 % à 20 % durant la deuxième semaine d'observation. Par contre, l'injection des autres doses supérieures à la dose 1 est associée à une diminution du poids corporel des rats expérimentaux comparés à leurs témoins. La chute de poids moyenne quotidienne est de 21 % à 27 % durant la première semaine et de 7 % à 20 % durant la deuxième semaine d'observation. Cette diminution du poids corporel est due, selon OCDE (2000), à la perte des réserves graisseuses et à une fonte musculaire chez l'animal lors d'une souffrance.

La croissance relative des rats est également un indicateur important de détérioration de l'état de l'animal selon Irvine et al. (1992). Elle représente le gain pondéral moyen par rapport au poids initial pendant la période d'observation, et donc reflète mieux les variations du poids corporel au cours du temps. La croissance relative des rats n'est pas affectée par l'injection de la dose 1 d'aziridine. Par contre, les capacités de croissance sont fortement diminuées suite à l'injection des doses 2, 3 et 4 d'aziridine puisque les rats expérimentaux ont présenté une croissance moindre que leurs témoins avec même perte de poids aux doses élevées, et ceci quelque soit l'aziridine testée. La perte de poids est d'autant plus importante que la dose augmente. En général, la chute pondérale est due en premier à une diminution de la masse grasse suivie de celle de la masse maigre. Elle représente la conséquence ultime d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports qui sont inférieurs aux dépenses énergétiques (Ritz et al., 2007). Dans notre travail, la perte de poids est associée à une diminution du poids de tous les organes, et elle est liée à une réduction de la consommation alimentaire chez les rats ayant reçu l'injection d'aziridine. La réduction de la consommation alimentaire est de plus en plus importante lorsque la dose injectée augmente et ceci quelque soit l'aziridine testée. Nos résultats montrent, que l'injection de la dose 1 d'aziridine ne provoque pas de variations significatives de l'ingestion d'aliments et d'eau chez les rats expérimentaux comparés aux témoins durant la première et la deuxième semaine d'observation. A la suite de l'injection des doses 2, 3 et 4 d'aziridine, les rats présentent une perte d'appétit, une réduction de la consommation alimentaire et d'eau qui se traduit notamment par une perte de poids importante. Ces signes peuvent être des marqueurs fiables de souffrance dans les études de toxicité. Plusieurs études ont mis en évidence le stress associé à une restriction alimentaire

produisant une perte de poids plus de 20 à 25 % chez le rat (Foltz et al., 1999 ; OCDE, 2001). D'un autre côté, les aziridines testées dans notre travail peuvent être considérées comme substances anorexigéniques à fortes doses, qui peuvent influencer le système nerveux central ou les neuromédiateurs. En effet, la régulation de la prise de nourriture met en jeu des structures nerveuses centrales et plus particulièrement l'hypothalamus (Williams et al., 2001 ; Morton et al., 2006). De plus, plusieurs neurotransmetteurs et hormones, comme par exemple la dopamine, la noradrénaline, la sérotonine, la leptine, l'insuline, sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire agissant sur les structures nerveuses centrales ou sur les différentes voies anaboliques et cataboliques influençant le comportement alimentaire et le poids corporel (Williams et al., 2001 ; Orsini, 2003). Diverses substances anorexigènes ont été identifiées et agissent soit directement sur le centre nerveux central, soit indirectement sur les neurotransmetteurs et les hormones régulant la prise alimentaire (Dorvault, 1995).

Cependant, les aziridines injectées peuvent en soi avoir des effets systémiques avec altérations des différents organes et syndrome inflammatoire qui peuvent moduler la prise alimentaire et l'ingestion d'eau. L'influence du stress physique entéroceptif qui correspond à des agressions ayant des conséquences sur le milieu intérieur, ainsi que celle des cytokines de l'inflammation sur le comportement alimentaire est actuellement bien connue (Orsini, 2003).

Les Variations de l'excrétion de fèces et d'urine sont aussi mesurés dans les études de toxicité (Morton, 1997 ; Toth, 1997). Nos résultats montrent, que l'injection de la première dose d'aziridine ne provoque pas de variations significatives de l'excrétion fécale et urinaire des rats expérimentaux pour l'ensemble des aziridines testées

comparés à leurs témoins. Par contre à des doses supérieures à 20 mg/kg, quelque soit l'aziridine testée, nous avons noté une réduction de l'excrétion urinaire chez les rats expérimentaux. La réduction du volume d'urine éliminée peut être liée à la diminution de l'apport en eau chez les rats traités. Dans les études toxicologiques, ce phénomène peut être expliqué par l'intoxication médicamenteuse qui touche la fonction rénale, ou par l'augmentation du taux de vasopressine suite à la stimulation de la neurohypophyse lors d'un stress, provoquant ainsi une concentration des urines et une diminution du volume émis (OCDE, 2001).

La diminution de l'excrétion fécale chez les rats expérimentaux résulte probablement de la restriction alimentaire observée chez les rats ayant reçu l'injection d'aziridine. Lors des études de toxicité, la réduction de l'excrétion fécale est liée à la dénutrition calorico-protéique suite à une anorexie généralement observée chez les rats expérimentaux (OCDE, 2001).

Le troisième paramètre dans les tests de toxicité, concerne les critères biochimiques et immunologiques (Manser, 1992). Les paramètres biochimiques varient lors d'un stress, de douleur ou de souffrance. Dans les tests toxicologiques, ces variations sont liées à la perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien traduisant une hyperglycémie liée à l'activation du système orthosympathique, une augmentation du taux plasmatique de créatine kinase liée à une atteinte du tissu musculaire, une diminution des β -lipoprotéines et du taux de cholestérol, ainsi qu'une augmentation de la concentration d'angiotensine, et de l'activité de la rénine, liées à la stimulation du système orthosympathique (Manser, 1992). Les variations immunologiques sont aussi importantes liées aux variations des différentes lignées lymphocytaires et des taux des lymphokines (Manser, 1992).

Dans notre travail, les aziridines entraînent de nombreuses modifications métaboliques qui s'accroissent avec la dose injectée. En effet, nos résultats montrent, que quelque soit l'aziridine testée, l'injection de la première dose ne provoque pas de variations significatives des taux en globules blancs, globules rouges et en hémoglobine des rats expérimentaux comparés aux témoins. Par contre une diminution progressive des globules rouges et de l'hémoglobine est notée chez les rats expérimentaux suite à l'injection des autres doses 2, 3 et 4 d'aziridines. De plus, les taux des globules blancs sont diminués suite à l'injection de fortes doses d'aziridine 2, alors qu'ils sont augmentés suite à l'injection des aziridines 1, 3 et 4.

L'anémie observée chez les rats traités peut résulter de plusieurs facteurs incluant une hémolyse accélérée causée par la présence d'aziridine dans le sang, ou une carence alimentaire particulièrement en micronutriments. Il est à rappeler que les rats traités présentent une réduction de la consommation alimentaire et une perte de poids de plus en plus importantes avec l'augmentation des doses injectées. La diminution des globules blancs par l'aziridine 2 peut être liée à la restriction alimentaire. Il a été démontré qu'une malnutrition protéino-calorique et en micronutriments tels que le fer et le zinc ainsi qu'en vitamines A et C cause une anémie, une atrophie du tissu lymphoïde, en particulier des aires T-dépendantes de la rate, du thymus, avec une diminution du nombre de lymphocytes et, surtout, du rapport CD4/CD8, et une diminution de l'action des cytokines réduisant ainsi l'activation et la différenciation des leucocytes, conduisant aux dysfonctions immunitaires (Birlouez et al., 2002).

Morton et Griffiths (1985), l'OCDE (2001) et le CCPA (1993) ont montré que l'anémie est un indicateur de détérioration à la fois de l'état nutritionnel et de l'état de santé corrélée à la souffrance ou à la douleur de l'animal dans les études de toxicité.

L'augmentation des taux de globules blancs observée à la suite de l'injection de fortes doses des aziridines 1, 3 et 4 peut traduire un phénomène inflammatoire, ou une augmentation de la défense immunitaire contre la présence des aziridines. En général, l'hyperleucocytose témoigne d'une réaction de l'organisme à une agression.

Dans notre travail, les effets des aziridines sur les variations des paramètres biochimiques sériques et urinaires sont aussi importants. Les résultats obtenus montrent que chez les rats expérimentaux, l'injection de la première dose d'aziridine n'entraîne aucune variation significative des teneurs sériques en cholestérol total (CT), en triglycérides (TG), en phospholipides (PL), en protéines totales et en glucose par rapport à leurs témoins. Cependant, aux autres doses élevées, quelque soit l'aziridine testée, les rats survivants montrent une hypocholestérolémie, une hypotriglycémie, une hypophospholipidémie, une hypoglycémie et une hypoprotéinémie par rapport à leurs témoins. Cette chute est significativement importante en fonction de la dose croissante d'aziridine injectée chez les expérimentaux par rapport à leurs témoins. Ces résultats peuvent être expliqués par la diminution d'apport et de synthèse des nutriments à la suite de la restriction alimentaire chez les rats traités aux aziridines. L'hypoglycémie est un marqueur bien connu lors de la sous-alimentation (Yanai et al., 2008)

Les taux faibles en protéines totales, particulièrement en albumine sont considérés comme des biomarqueurs de la malnutrition protéino énergétique, suite à la diminution d'apport en acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines (Carriere et al., 2008).

La diminution des taux lipidiques lors de l'anorexie observée chez les rats expérimentaux s'explique probablement par la diminution de la synthèse lipidique

suite au manque d'acides gras exogènes avec l'épuisement des stocks endogènes des triglycérides dans le tissu adipeux. La réduction des taux de CT, TG et PL circulants chez ces rats expérimentaux peut être la conséquence de la réduction de leur synthèse hépatique. Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus au cours du marasme et du kwashiorkor (Coward et al., 1981).

Manser (1992) a montré une diminution des β -lipoprotéines (LDL) et du taux de cholestérol sérique chez les animaux lors de souffrance dans les études toxicologiques. Nos résultats concordent avec les directives de l'OCDE (2001), qui ont montré que la souffrance et la douleur observées lors des études de toxicité est associée à une réduction des taux glucidiques, lipidiques et protéiques suite à la diminution de la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse. Cette dernière, hormone inhibe la corticosurrénale et, par ce biais diminue la libération des glucocorticoïdes diminuant la synthèse glucidique, lipidique et protéique. Il s'agit d'une réponse physiologique au stress, préparant l'organisme à une diminution de l'activité motrice.

Les glucocorticoïdes sont des hormones qui participent à la régulation du métabolisme général et à l'homéostasie. Les glucocorticoïdes régulent le métabolisme glucidique en stimulant la néoglucogenèse et la glycogénogenèse. De plus, ils régulent le métabolisme protéique. Les glucocorticoïdes provoquent dans les tissus périphériques une diminution de l'anabolisme et une augmentation du catabolisme ce qui fournit des acides aminés pour la néoglucogenèse. Ils stimulent la lipolyse ce qui entraîne une augmentation des concentrations sériques en acides gras libres et cholestérol (Macfarlane et al., 2008 ; Watanabe et al., 2008). Vu ces actions métaboliques des glucocorticoïdes, leur taux bas explique donc les taux faibles circulants en protéines, lipides et glucides. De plus, des études ont montré que lors

De l'insuffisance

d'une diminution de la sécrétion d'ACTH, la production hépatique de glucose est diminuée et la sensibilité des récepteurs spécifique à l'insuline est augmentée. Ceci combinée à l'anorexie par augmentation de CRH (facteur anoxerigène), peut engendrer une hypoglycémie (Annikova, 1974 ; López et al., 1995 ; Abs et al., 2000). Nos résultats montrent que les rats recevant une forte dose d'aziridine présentent une augmentation des teneurs sériques en créatinine, urée et acide urique avec diminution de leurs taux urinaires. Ces anomalies peuvent être liées à une altération de la fonction rénale. Le risque d'apparition d'une insuffisance rénale et /ou d'une dysfonction tubulaire au cours d'une chimiothérapie anticancéreuse est maintenant bien connu pour la plupart des médicaments utilisés par les oncologues (Isnard-Bagnis et al., 2005 ; Schortgen , 2005).

La néphrotoxicité liée aux médicaments anticancéreux peut se manifester par une insuffisance rénale aiguë ou des anomalies tubulaires. Cependant, la toxicité rénale des nouvelles aziridines testées dans notre étude n'a pas été documentée précédemment. Certaines aziridines ont montré également des effets toxiques au niveau du rein. Le cyclophosphamide, et le thiotépa, sont des agents alkylants de la famille des aziridines, utilisés dans le traitement de diverses maladies néoplasiques et hématologiques et possédant des effets néphrotoxiques. Le cyclophosphamide et le thiotépa montrent chez les cancéreux une néphrotoxicité sur les cellules du tubule collecteur à des fortes doses (1,500 mg/m², cyclophosphamide et 120 mg/m², thiotépa), se manifestant par des troubles rénaux tels qu'une hyponatrémie et une hypercréatinémie, marqueurs de la fonction rénale (Zeller et al ., 2003 ; De Jonge et al., 2005; Ekhart et al., 2008)

Par ailleurs, Brain et ses collaborateurs (2008) ont montré également que l'ifosfamide, un autre agent alkylant anticancéreux proche du cyclophosphamide, est responsable de la dysfonction tubulaire et d'insuffisance rénale avec une augmentation des taux en créatinine, en urée et en acide urique, chez les malades traités. Les travaux de Chen et al. (2008) ont montré qu'injection d'ifosfamide chez les rats à une dose de 50 à 80 mg /kg provoque une dysfonction tubulaire se traduisant par une insuffisance rénale, avec une augmentation de la créatinine sérique.

La créatinine, l'urée et l'acide urique constituent d'excellents marqueurs de la fonction rénale, leur augmentation ou leur diminution reflète un dysfonctionnement rénal.

La créatinine est le meilleur marqueur de la fonction rénale. Elle est formée dans l'organisme par déshydratation non enzymatique de la créatine synthétisée par le foie et stockée dans le muscle. Un taux sérique élevé en créatinine (associé à un taux élevé en urée) traduit une diminution de la filtration glomérulaire. L'acide urique, représente un autre marqueur de la fonction rénale. Il est le produit final du catabolisme des purines (adénosine et guanidine) endogènes et exogènes (origine alimentaire). Le taux d'acide urique dans le sérum peut augmenter lors de désordres métaboliques, troubles nutritionnels, ou d'atteintes rénales. L'urée, un autre marqueur reflétant la fonction rénale, provient de la destruction des protéines. Elle est entièrement filtrée par les glomérules. Son taux sanguin reflète le fonctionnement global des reins. Dans notre étude, l'injection d'aziridines à la première dose (inférieure à 10 mg/kg), ne provoque pas de variations des taux urinaires et sériques en créatinine, en acide urique et en urée chez les différents groupes de rats traités par rapport à leurs témoins. Par contre, l'injection des autres doses d'aziridines (supérieures à 20 mg / kg), a provoqué chez

les rats une augmentation sérique de ces paramètres associés à une diminution de leurs taux urinaires.

Il ressort que les aziridines testées chez les rats provoquent une toxicité dose-dépendante de la fonction rénale.

Les effets des aziridines sur les organes sont aussi déterminés dans notre travail. Nos résultats montrent, que quelque soit l'aziridine testée, l'injection de la première dose n'affecte pas le poids ni la composition des différents organes (foie, rein, rate, pancréas, cœur, tissu adipeux, muscle, et le cerceau). Par contre, l'injection des autres doses élevées est associée à une diminution des poids des différents organes. Cette diminution est plus importante aux doses 3 et 4, quelque soit l'aziridine testée. De plus, cette réduction des poids des organes est associée à une diminution de leurs teneurs en lipides totaux et en protéines totales chez les rats recevant de fortes doses d'aziridine.

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules. Leur augmentation sérique reflète une lésion cellulaire en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire (Valdiguié, 2000).

Les valeurs moyennes des transaminases glutamo-oxaloacétique (TGO) et glutamo-pyruvique (TGP) sont restées dans les limites normales chez tous les groupes de rats expérimentaux comparées à leurs témoins, suite à l'injection de la première dose d'aziridine. Cependant, une augmentation significative des transaminases est notée chez les rats expérimentaux par rapport à leurs témoins, après l'injection de la dose 2, 3 et 4 et ceci quelque soit l'aziridine testée. Ceci reflète une atteinte au niveau des organes avec cytolysse, surtout hépatique. Certaines aziridines ont également montré des effets toxiques au niveau du foie. Le cyclophosphamide et l'ifosfamide sont des

hépatotoxiques métabolisés par voie hépatique par la chaîne oxydative des cytochromes P450 (Lahouel et al., 2004).

Feun et ses collaborateurs (1999) ont montré que le Thiotépa utilisé à une dose de 9 à 24 mg / m² chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire provoque une élévation de la créatinine sérique, de la bilirubine et des transaminases.

Il a été démontré qu'au cours de l'anorexie et de l'amaigrissement, les transaminases sériques sont augmentées (Rautou et al., 2007). Ce phénomène semble être lié à une hypoxie hépatique suite à une baisse du débit cardiaque, provoquant une lyse cellulaire (Rivera-Nieves et al., 2000 ; Rautou et al., 2007). La cytolysse hépatique est importante lors des dénitritions protéiques et lors du jeûne (Di Pascoli et al., 2004). Il apparaît clairement que, dans notre travail, l'hépatotoxicité des aziridines testées à fortes doses, est majorée par la restriction alimentaire observée chez les rats expérimentaux. Il ressort de tous nos résultats que les aziridines testées sont toxiques à des doses supérieures à 20 mg/kg. Cependant, à des doses inférieures à 10mg/kg, ces substances ne provoquent aucune altération clinique ni métabolique. Cette notion de seuil de toxicité est très importante dans les essais de toxicité et permet de définir la dose sans effet toxique observable (NOAEL). Cette NOAEL est un critère primordial dans les essais cliniques de première administration à l'homme puisqu'elle sert de base de calcul de la première dose utilisée chez l'homme (NOAEL / Facteur de Sécurité ; avec Facteur de Sécurité ≥ 10) (Afssaps, 2006). Dans notre travail, les doses NOAEL correspondent aux doses 1(6.5 mg/kg pour l'aziridine 1 ; 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2 ; 8.75 mg/kg pour l'aziridine3 ; 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). D'après les recommandations de l'Afssaps (2006), afin de garantir la sécurité des patients utilisant un nouveau médicament, il faut s'assurer que la dose NOAEL n'a aucun effet sur le

comportement alimentaires et les bilans nutritionnels. Pour étudier ceci et vérifier la non toxicité de cette dose NOAEL, nous avons réalisé les bilans nutritionnels chez les rats. Les bilans nutritionnels sont réalisés sur une période de un mois. Nos résultats montrent une prise alimentaire similaire entre les groupes de rat témoins et expérimentaux (recevant la NOAEL) et donc un apport énergétique égal, ainsi que le rapport d'efficacité nutritionnelle (REN). Ceci est en faveur du fait que les aziridines à la dose NOAEL n'affectent pas la consommation alimentaire et la digestibilité des nutriments. De plus, les rats expérimentaux montrent une croissance normale par rapport aux témoins durant le mois d'expérimentation.

Le bilan azoté (BA) indique l'évolution nette de la masse protéique. Il est positif lorsque la masse protéique s'accroît en période de croissance, proche de zéro lorsque la masse protéique est constante, et négatif dans des circonstances pathologiques accompagnées d'une perte protéique. Au cours des bilans nutritionnels BI (première semaine) et BII (quatrième semaine), l'azote ingéré qui représente l'azote de la nourriture ingérée est similaire chez les rats expérimentaux comparés aux témoins. De plus, les azotes urinaires et fécaux sont similaires entre les deux groupes ce qui contribue à la similitude des coefficients d'utilisations digestive (CUD_N) et des BA. Ces résultats témoignent d'une bonne utilisation métabolique de l'azote chez les rats ayant reçu la dose NOAEL d'aziridines.

L'azote fécal correspond à l'azote alimentaire non absorbé mais aussi à l'azote endogène. Il reste dans les valeurs normales chez les rats expérimentaux, ce qui est signe d'une bonne assimilation protéique par les rats ayant reçu la dose NOAEL d'aziridine. Aux différents bilans, la digestion des lipides n'est pas perturbée par l'injection de la dose NOAEL d'aziridine chez les rats. En effet, les lipides ingérés, les

lipides fécaux et les coefficients d'utilisations digestives des lipides (CUD_L) sont comparables chez les rats expérimentaux et témoins.

Il apparaît donc clairement que les aziridines, à la dose NOAEL, n'ont aucun effet sur les bilans nutritionnels chez les rats.

Afin de confirmer la non toxicité des aziridines à la dose NOAEL, nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau des organes (le foie, le poumon, la rate, le muscle gastrocnémien, le pancréas, le rein, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux) chez les rats témoins et chez les rats traités par l'aziridine. L'examen histologique est conçu dans le but de compléter nos résultats précédents. Dans notre étude, nous avons utilisé l'aziridine 3 ($R = PhCH_2$) la plus immunostimulante, afin d'étudier ses effets au niveau des organes cibles.

La recherche des effets des aziridines sur l'histologie du foie est d'une importance capitale. Le foie est un organe vital. Il remplit de multiples fonctions, il participe à la digestion, à l'emmagasinage des aliments ainsi qu'à la détoxification, en aidant l'organisme à se débarrasser de ses poisons, et à l'élimination. C'est un organe cible pour de nombreux toxiques à cause de son important débit sanguin et de sa situation par rapport à la circulation sanguine (Deugnier, 2005). La plupart des médicaments anticancéreux en général et les aziridines en particulier, comme le cyclophosphamide, l'ifosfamide et le thiotépa, subissent une biotransformation avant leur élimination. Cette biotransformation se déroule au niveau du réticulum endoplasmique lisse (ou microsomes) du foie, par un système enzymatique, les cytochromes P-450. Les cytochromes P-450 appartiennent à la famille des enzymes d'oxydo-réduction. Ce sont des activateurs impliqués dans la dégradation hépatique des molécules exogènes, en particulier des médicaments (Lokiec, 2007 ; Walsky et al., 2007 ; Maes et al.,

2008). L'examen microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau du foie de rats traités par l'aziridine, montre une structure hépatique normale, ce qui témoigne de la non toxicité à la dose NOAEL.

Certains médicaments anticancéreux ont montré des effets toxiques au niveau du poumon. Les moutardes à l'azote (chlorambucil, chlormétine, melphalan) qui sont des agents alkylants ont essentiellement une toxicité pulmonaire, entraînant une fibrose pulmonaire à des fortes doses (Grootenboers et al., 2007). Les nitroso-urées peuvent entraîner des complications pulmonaires, de type pneumonie interstitielle ou alvéolite fibrosante (Massin et al., 1992). Le cyclophosphamide est un autre anticancéreux le mieux connus par sa toxicité pulmonaire avec une lésion endothéliale, parfois létale (Gupta et al., 2007). Dans notre étude, l'examen histologique, au niveau des poumons, montre une structure tissulaire normale aussi bien chez les rats témoins que chez les rats traités par l'aziridine à la dose NOAEL.

Les fonctions principales de la rate sont de filtrer le sang, le régénérer, le stocker et en évacuer les bactéries. Cet organe important aux fonctions multiples est donc particulièrement vulnérable à différentes maladies et à divers médicaments (Sosso et al., 1992 ; Shaked et al. 2005).

Plusieurs molécules anticancéreuses altèrent l'architecture de la rate (Fabien et al., 2003). Cependant, l'action des aziridines sur l'histologie de la rate, n'a pas été mise en évidence. Dans notre étude, l'examen des coupes histologiques réalisées au niveau de la rate, nous montre un aspect tissulaire normal aussi bien chez les rats traités par l'aziridine à la dose NOAEL, que chez les rats témoins.

Le muscle gastrocnémien a été étudié afin de voir si l'aziridine entraîne ou non une lésion au niveau du muscle. Raynard (2005) a montré, chez les patients cancéreux,

que certaines substances anticancéreuses, ainsi qu'une corticothérapie prolongée entraînent une fonte musculaire liée à une activation des voies protéolytiques musculaires accompagnée d'asthénie, d'anorexie, et des troubles digestifs chez les cancéreux. Les atteintes musculaires lors d'un traitement anticancéreux sont surtout liées aux altérations de la vascularisation au niveau du muscle (Baudin, 1995). Dans notre étude, aucune altération tissulaire n'est observée chez les rats traités par l'aziridine à la dose NOAEL choisie.

De nombreux médicaments anticancéreux alkylants sont à l'origine d'insuffisance cardiaque, le cyclophosphamide Endoxan à une forte dose (4 g/m^2) provoque chez les patients cancéreux une cardiotoxicité aiguë (Zver et al., 2007). L'ifosfamide Holoxan à la dose de 10 à 18 g/m^2 provoque une fragmentation des fibres myocardiques (Quezado et al., 1993). La mitomycine C est responsable au cours des premières administrations de choc cardiogénique ou d'insuffisance cardiaque (Dorr et al., 1992).

Dans notre étude, l'examen des coupes histologiques réalisées au niveau du coeur montre un aspect tissulaire normal des cellules myocardiques aussi bien chez les rats traités par l'aziridine à la dose NOAEL, que chez les rats témoins.

La toxicité pancréatique est un des effets secondaires imprévisibles apparus dans certains cas chez les patients cancéreux lors des chimiothérapies anticancéreuses (Runzi et al., 1996). En effet, Izraeli et ses collaborateurs (1994) ont montré que l'ifosfamide administré chez les femmes atteintes d'un cancer du sein provoque une pancréatite aiguë médicamenteuse, liée à une activation intrapancréatique des enzymes digestives par un mécanisme mal connu. Dans notre étude, l'examen microscopique des coupes histologiques ne révèle aucune altération pancréatique chez les rats traités par l'aziridine à la dose NOAEL.

Le tissu adipeux est une glande endocrine impliquée dans le stockage des graisses (Luzi et al., 2005). Il est peu vascularisé. L'irrigation des tissus est un facteur limitant de la distribution tissulaire des médicaments. Nos résultats sur l'analyse des coupes histologiques ne montre aucune altération des adipocytes chez les rats traités par l'aziridine à la dose NOAEL.

L'élimination de nombreuses drogues et de leurs métabolites se fait par les reins qui sont donc particulièrement exposés lors des chimiothérapies. La tolérance rénale des anticancéreux est un problème d'actualité lié à la fois à la toxicité intrinsèque de certaines chimiothérapies anticancéreuses et à l'état du patient cancéreux. Le patient atteint de cancer est en effet exposé à différents types d'atteinte rénale (obstructive, fonctionnelle, secondaire aux traitement) avec altération tissulaire (Bagnis et al., 2005). Dans notre étude, l'examen des coupes histologiques réalisées au niveau du rein, ne révèle aucune altération structurale du rein, aussi bien chez les rats traités par l'aziridine à la dose NOAEL, que chez les rats témoins.

La neurotoxicité constitue un autre effet secondaire lors des chimiothérapies anticancéreuses, comme l'ifosfamide. La toxicité de ce médicament, notamment du système nerveux central (CNS) est présentée dans 20% à 30% des patients cancéreux traités par l'ifosfamide, caractérisée par une encéphalopathie métabolique entraînant ainsi un coma (Ajithkumar et al., 2007 ; CLokiec, 2007). La neurotoxicité d'autres agents anticancéreux a été également signalée (Lebrun et al., 2003). Nos résultats ne révèlent aucune altération structurale du tissu nerveux chez les rats traités par l'aziridine à la dose NOAEL suite à l'examen histologique, ce qui confirme la non toxicité de cette dose d'aziridine. Ainsi, l'aziridine à la dose NOAEL n'affecte pas l'histologie des organes.

De ces résultats, il apparaît clairement que l'emploi de ces aziridines nouvellement synthétisées au niveau du laboratoire COSNA peut être recommandé à la dose NOAEL (inférieure à 10mg/kg) et ouvre une nouvelle voie d'approche pour l'immunothérapie à médiation non spécifique, cellulaire et/ou humorale, au cours du cancer, des infections ou des syndromes d'immunodéficiences.

Notre recherche s'inscrit dans le cadre du développement de nouveaux médicaments ciblant des phénomènes biologiques scientifiques du cancer. Dans notre travail, nous avons prouvé que les aziridines de synthèse possèdent des effets sur la modulation du système immunitaire qui peuvent être très bénéfiques au cours du cancer où une immunodéficience est bien démontrée. Les quatre nouvelles aziridines synthétisées au laboratoire COSNA à partir d'acides aminés (*N*-phtalimidoglycyl-2-hydroxyméthylaziridine, aziridine 1 ; *N*-phtalimidoalanyl-2-hydroxyméthylaziridine, aziridine 2 ; *N*-phtalimidophénylalanyl-2-hydroxyméthylaziridine, aziridine 3 et *N*-phtaloyltryptophyl-2-hydroxyméthylaziridine, aziridine 4) montrent ces effets immunomodulateurs in vitro. Leurs caractères alkylants de l'ADN sont détectés par une électrophorèse sur gel d'agarose en milieu alcalin montrant une réduction marquée de la mobilité électrophorétique de l'ADN et un effet comète.

Notre étude in vitro nous a permis de prouver que ces quatre aziridines sont capable de moduler la prolifération des lymphocytes non seulement chez les femmes témoins mais aussi chez les femmes atteintes d'un cancer du sein. En effet, aux concentrations (0µM-1µM-10µM-50µM-500µM-1mM), ces aziridines possèdent in vitro un effet immunomodulateur important sur les cellules à médiation cellulaire et humorale. Dans notre étude, l'aziridine 1, 3, 4 augmentent la prolifération des lymphocytes T et B d'une façon dose-dépendante, exprimée par le nombre de cellules, par l'indice de prolifération (IP) et par le contenu en protéines totales suggérant que ces substances sont immunostimulantes. De plus, l'aziridine 1, 3 et 4 augmentent significativement la sécrétion des IL-2 et IL-6, aussi bien chez les témoins que chez les femmes cancéreuses. Ces interleukines sont des facteurs importants de maturation et de croissance des lymphocytes. Cependant, l'aziridine 2 réduit la prolifération in vitro

des lymphocytes suite à la diminution de la production des IL 2 et IL 6 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses, suggérant que cette substance est immunosuppressive.

Nos résultats montrent que l'aziridine 3, la plus immunostimulante, n'a pas d'effets sur la composition en acides gras des phospholipides (PL) des membranes des lymphocytes. En effet, à la concentration de 1mM, l'aziridine 3 n'a entraîné aucune modification des AGS, des AGPI et des AGMI suggérant que son effet immunostimulant est différent de celui de l'agent mitogène Con A, puisque l'activation de la prolifération par la Con A altère la composition en acide gras membranaires.

Afin de proposer ces aziridines comme moyen thérapeutiques, nous avons réalisé une étude in vivo visant à déterminer les effets de ces nouvelles molécules chez le rat Wistar, animal de laboratoire choisi pour les essais toxicologiques. Les tests de toxicités aiguës constituent la première étape des expérimentations précliniques avant tout essai chez l'être humain. Nos résultats montrent que la DL50 est de 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.50 mg/kg pour l'aziridine 2, 100 mg/kg pour l'aziridine 3 et 104.71 mg/kg pour l'aziridine 4. Selon l'échelle de toxicité internationale, les quatre aziridines se classent comme substances moyennement toxiques. Les symptômes de toxicité sont apparus 24 heures après l'injection d'aziridine et se sont caractérisés par des troubles de l'équilibre, de la posture, le grattage, la chute de poils, l'aspect des fèces, la présence de diarrhées, la chute du poids corporel, l'agressivité, les saignements, l'hypersalivation, la diminution de la température rectale et la réduction de l'ingestion de nourriture et d'eau. Ces symptômes sont provoqués par des doses

supérieures à 20 mg/kg et deviennent sévères et intenses avec l'augmentation de la dose quelque soit l'aziridine testée.

Nos résultats montrent, que quelque soit l'aziridine testée, l'injection d'une dose inférieure à 10 mg/kg ne provoque pas de variations des paramètres hématologiques, biochimiques (sériques et urinaires), du poids et la composition des organes (foie, rein, rate, pancréas, cœur, tissu adipeux, muscle, et le cerceau) et des activités des transaminases sériques. Par contre, l'injection des doses supérieures à 20 mg/kg induit chez les rats des perturbations de plus en plus sévères avec l'augmentation de la dose. Les altérations touchent les paramètres hématologiques (globules blancs, globules rouges, hémoglobine) et les paramètres biochimiques (glucose, cholestérol total, triglycérides, phospholipides, protéines totales, créatinine, urée et acide urique sériques ou urinaires). De plus, une diminution des poids des différents organes (foie, rein, rate, pancréas, cœur, tissu adipeux, muscle, et le cerceau) associée à une diminution de leurs teneurs en lipides totaux et en protéines totales et à une augmentation des transaminases sont observées chez les rats recevant des doses élevées. Toutes ces modifications peuvent être liées à la dénutrition marquée observée chez ces rats. En effet, les aziridines à fortes doses semblent être anorexigènes puisqu'elles entraînent une réduction de la consommation alimentaire.

Il apparaît clairement que la dose sans effet toxique observable (NOAEL) est inférieure à 10 mg/kg pour toutes les aziridines testées dans notre travail.

L'étude histologique réalisée au niveau des organes (le foie, le poumon, la rate, le muscle gastrocnémien, le pancréas, le rein, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux) a permis de confirmer la non toxicité de cette dose NOAEL. En effet, aucune altération tissulaire n'est observée chez les rats recevant l'aziridine à la dose NOAEL. De plus,

cette dose n'affecte pas les bilans nutritionnels des rats, ce qui répond aux critères exigés par l'organisation de coopération et de développement économique (OCDE) et par Food and drug administration (FDA) concernant les premières doses proposées pour les essais cliniques.

L'activité immunostimulante de ces nouvelles aziridines peut être donc recommandée pour des essais cliniques dans le traitement des anomalies immunologiques, ouvrant ainsi une nouvelle voie d'approche pour l'immunothérapie à médiation non spécifique, cellulaire et/ou humorale, au cours du cancer. D'après nos tests de toxicité aigue, des doses inférieures à 10 mg/kg de ces aziridines peuvent être recommandées dans l'élaboration du protocole d'un essai de première administration chez l'homme. Cependant, d'autres études, comme les tests de toxicité chronique sont nécessaires afin de s'assurer la non toxicité à long terme de ces aziridines. C'est dans cette optique que nous souhaitons poursuivre nos travaux de recherche dans le cadre de nos activités post-doctorales. De plus, nous espérons aussi caractériser et mieux définir les effets immunomodulateurs de ces aziridines en réalisant le dosage d'autres interleukines (IL-4 et interféron par exemple), le phénotypage des lymphocytes (Th1 et Th2) et en spécifiant leurs actions in vivo sur l'ensemble du système immunitaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abs R, Verhelst J, Maeyaert J, Van Buyten JP, Opsomer F, Adriaensen H, Verlooy J, Van Havenbergh T, Smet M, Van Acker K (2000) Endocrine consequences of long-term intrathecal administration of opioids. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (6):2215-2222.
2. Acred P, Hennessy TD, Macarthur- Clark JA, Merrikin DJ, Ryan DM, Smulders HC, Troke PF, Wilson RG, Straughan DW (1994) Guidelines for the welfare of animals in rodent protection tests : A Report of the Rodent Protection Test Working Party. *Laboratory Animals*, 28 (1):13-18.
3. Afssaps (2006) Essais cliniques de première administration à l'homme, en dose unique d'un médicament expérimental. Choix de la première dose, de la progression de dose et protocole d'administrations aux volontaires. Agence Française Sécurité Sanitaire, 1-5.
4. Ajithkumar T, Parkinson C, Shamshad F, Murray P (2007) Ifosfamide encephalopathy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 19 (2):108-114.
5. Alam SM, Clark JS, George WD, Campbell AM (1993) Altered lymphocyte populations in tumor invaded nodes of breast cancer patients. *Immunol Lett*, 35 (3):229-234.
6. Alberti P, Lacroix L, Guittat L, Helene C, Mergny JL (2003) Nucleic acids as targets for antitelomerase agents. *Mini Rev Med Chem*, 3(1): 23-30.
7. Altman A, Coggeshall KM, Mustelin T (1990) Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol*, 48: 27-36.
8. Annikova II (1974) Certain indicators of carbohydrate metabolism in children with hypocorticism. *Vopr Okhr Materin Det*, 19 (7):50-52.

9. Antony PA, Paulos CM, Ahmadzadeh M, Akpinarli A, Palmer DC, Sato N, Kaiser A, Hinrichs CS, Klebanoff CA, Tagaya Y, Restifo NP (2006) Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J Immunol*, 176:5255-5266.
10. Baba AF, Medjahed W, Merzouk H, Kajima Mulengi J, Belleville J, Prost J (2006) Effects of N-acyl-2-hydroxymethyl aziridines on in vitro proliferative responses of human lymphocytes stimulated by mitogens. *Gen Physiol Biophys*, 25: 277-287.
11. Baba Ahmed FZ, Bouanane S, Merzouk SA, Merzouk H, Medjahed W, Kajima Mulengi J, Prost J (2008) 2-hydroxy-methyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine stimule la prolifération in vitro des lymphocytes humains et la sécrétion des interleukins. *Pathologie Biologie*, 56: 137-142.
12. Bagga D, Anders KH, Wang HJ, Glaspy J (2002) Long-chain n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratios in breast adipose tissue from women with and without breast cancer. *Nutr Cancer*, 42: 180-185.
13. Bagnis CI, Moulin B, Vacher VL, Deay G (2005) Toxicité rénale des anticancéreux. *J Nephrol Therap*, 1: 101-114.
14. Baier J, Neumann HA, Ricken O (1991) No inhibition of interferon gamma release in human lymphocytes by Ciamezone. *Cancer Treat Rep*, 62 (11):1987-1996.
15. Balicki D (2007) Moving Forward in Human Mammary Stem Cell Biology and Breast Cancer Prognostication Using ALDH1. *Cell Stem Cell*, 1(5):485-487.
16. Baudin B (1995) Toxicité endothéliale des chimiothérapies anticancéreuses. *Sang Thromb Vais*, 7 : 175-184.

17. Bay Jo, Choufi B, Faucher C, Blaise D (2001) Greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques dans les tumeurs solides. *Bull Cancer*, 88: 900-907.
18. Bercovici N, Duffour MT, Agrawal S, Salcedo M, Abastado JP (2000) New methods for assessing T-cell responses. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 859-864.
19. Bicker U (1978) Immunomodulating effects of BM 12.531 in animals and tolerance in man. *Cancer Treat Rep*, 11:1987-1996.
20. Bickers DR, Athar M (2000) Novel approaches to chemoprevention of skin cancer. *J Dermatol*, 27 (11):691-695.
21. Bien E, Balcerska A (2007) Serum soluble interleukin 2 receptor alpha in human cancer of adults and children: a review. *Biomarkers*, 28:1-26.
22. Biesma B, Van de Werf PR, Melissant CF, Brok RG (2007) Anaemia management with epoetin alfa in lung cancer patients in The Netherlands. *Lung Cancer*, 58 (1): 104-110.
23. Birlouez I, Cals MJ, Covi G, Faure H, Jardel A, Leroni A, Therond P, Vodailhet M (2002) Carences Vitaminiques et dénutritions. *Ann Biol Clin*, 60: 443-450.
24. Bishop GA, Hsing Y, Hostager BS, Jalukar SV, Ramirez LM, Tomai MA (2000) Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848. *J Immunol*, 165:5552-5557.
25. Blidaru A, Bordea CI, Vișoreanu CG, Bordea M, Iliescu I, Duțescu D, Radu F, Drăgoescu H (1998) Interleukin-2 alterations in the immune status of patients with mammary neoplasm. *Rom J Physiol*, 35 (1-2):127- 134.
26. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can Physiol Pharmacol*, 37: 911-917.

27. Blouin JM, Chaves VE, Bortoli S, Forest C (2006) Effets des acides gras sur l'inflammation et le cancer. *Lipides et inflammations*, 13 (5): 331-336.
28. Boitard C, Revillard JP (1999) Induire ou rétablir une tolérance immunitaire ? *Médecine Thérapeutique*, 5 (2): 115-122.
29. Bouet-Toussaint F, Genetet N, Rioux-Leclercq N (2000) Interleukin 2 expanded lymphocytes from lymph node and tumor biopsies of human renal cell carcinoma, breast and ovarian cancer. *Eur Cytokine Netw*, 11: 217-224.
30. Bougnoux P (1999) N-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2: 121-126.
31. Bower JE, Ganz PA, Aziz N, Fahey JL, Cole SW (2003) T-cell homeostasis in breast cancer survivors with persistent fatigue. *J Natl Cancer Inst*, 95 (15):1165-1168.
32. Boyd NF, Stone J, Vogt KN, Connelly BS, Martin LJ, Minkin S (2003) Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *J Cancer*, 89: 1672-1685.
33. Bracci L, Moschella F, Sestili P, La Sorsa V, Valentini M, Canini I, Baccarini S, Maccari S, Ramoni C, Belardelli F, Proietti E (2007) Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clin Cancer Res*, 13:644-653.
34. Brain EG, Rezai K, Lokiec F, Gutierrez M, Urien S (2008) Population pharmacokinetics and exploratory pharmacodynamics of ifosfamide according to continuous or short infusion schedules: an n = 1 randomized study. *J Clin Pharmacol*, 65 (4):607-610.

35. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM (2002) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe. *European Journal of Cancer*, 38: 99–166.
36. Brenner B, Koppenhoefer U, Lepple-Wienhues A, Grassmé H, Müller C, Speer CP, Lang F, Gulbins E (1997) The CD40 ligand directly activates T-lymphocytes via tyrosine phosphorylation dependent PKC activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 239 (1): 11-17.
37. Brittenden J, Heys SD, Ross J, Eremin O (1996) Natural Killer cells and cancer. *Cancer*, 77 (7):1226–1243.
38. Brun B, Piedbois P (1998) Chimiothérapies anticancéreuses (hormonothérapie incluse). Classification, principaux effets secondaires. *Revue du Praticien*, 48 (14) : 1587-1600.
39. Büssing A, Stumpf C, Tröger W, Schietzel M (2007) Course of mitogen-stimulated T lymphocytes in cancer patients treated with *Viscum album* extracts. *Anticancer Res*, 27: 2903-2910.
40. Calder PC, Bond JA, Bevan SJ, Hunt SV, Newsholme EA (1991) Effect of fatty acids on the proliferation of concanavalin A-stimulated rat lymph node lymphocytes. *Int J Biochem*, 23 (5-6): 579-588.
41. Calder PC, Yaqoob P, Harvey DJ, Watts A, Newsholme EA (1994) Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *J Biochem*, 300 (2): 509-518.
42. Cantrell DA, Smith KA (1984) The interleukin 2 T-cell system: a new cell growth model. *Science*, 224 (4655):1312–1316.
43. Cantrell DA (1996) T-cell antigen receptor signal transduction pathways. *Cancer Surv*, 27: 165–175.

44. Carriere I, Dupuy AM, Lacroux A, Cristol JP, Delcourt C (2008) Biomarkers of inflammation and malnutrition associated with early death in healthy elderly people. *Cancer Chemother Pharmacol*, 31 (1):1-5.
45. Cassatella MA, Anegón I, Cuturi MC, Griskey P, Trinchieri G, Perussia B (1989) Fc gamma R(CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca²⁺ in Fc gamma R (CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med*, 169 (2):549-567.
46. CCPA, Conseil Canadien de Protection des Animaux (1989) Principes régissant la recherche sur les animaux. Ottawa.
47. CCPA, Conseil Canadien de Protection des Animaux (1993) Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. Ottawa, 1 : 232.
48. Chan CW, Housseau F (2008) The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ*, 15 (1): 58- 69.
49. Chen N, Aleksa K, Woodland C, Rieder M, Koren G (2008) N-Acetylcysteine prevents ifosfamide-induced nephrotoxicity in rats. *J Pharmacol*, 153 (7):1364-1372.
50. Chouaib S, El Hage F, Benlalam H, Mami-Chouaib, F (2006) Immunotherapy of cancer: promise and reality. *Médecine /Science*, 22 (8): 755-759.
51. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH (2007) Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion (2007) *Cancer Res*, 67 (19):9518-27.
52. Claude A (1988) Investigations toxicologiques pour un nouveau médicament. Dans : Giroud J. P et Coll, Ed. *Pharmacologie clinique / bases de la thérapeutique*. 2ème édition. Paris: Expansion scientifique française, 3 -14.

53. CLokiec F (2007) Ifosfamide: a chemotherapeutic agent with pharmacokinetic properties capable of preventing the cerebral metastasis of certain cancers. *Oncology*, 9 (11): 790-794.
54. Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Røsjø E, Omholt H, Hofgaard PO, Haraldsen G, Bogen B (2005) Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*, 22 (3):371-83.
55. Corthay A (2007) CD4+ T cells cooperate with macrophages for specific elimination of MHC class II-negative cancer cells. *Adv Exp Med Biol*, 590: 195-208.
56. Coward WA, Lunn PG (1981) The biochemistry and Physiology of Kwashiorkor and marasmus. *Med Bull*, 37 (1): 19-24.
57. De Jonge ME, Huitema ADR, Rodenhuis S, Beijnen JH (2005) Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet*, 44 (11):1135-1164.
58. Den Brok WJ, Nuijen B, Hillebrand M, Lutz C, Opitz HG, Beijnen J H (2005) LC-UV method development and validation for the investigational anticancer agent imexon and identification of its degradation products, 38 (4): 686-694.
59. Denys A , Aires V, Hichami A and Khan NA (2004) Thapsigargin-stimulated MAP kinase phosphorylation via CRAC channels and PLD activation: inhibitory action of docosahexaenoic acid. *FEBS Letters*, 564 (1-2): 177-182.
60. Deugnier Y (2005) Anatomie-Physiologie du foie. *Univ-Rennes1-Poecopie Médecine M2-Sémiologie du Foie et des Voies Biliaires*, 1-7.
61. Di Francesco AM, Hargreaves RH, Wallace TW, Mayalarp SP, Hazrati A, Hartley JA, Butler J (2000) The abnormal cytotoxicities of 2,5-diaziridinyl-1,4-benzoquinone-3-phenyl esters. *Anticancer Drug Des*, 15 (5):347-359.

62. Di Pascoli L, Lion A, Millazo D Caregaro L (2004) Acute liver damage in anoxeria nervosa. *Int J Eat Disord*, 36 (1):114 -117.
63. Domchek SM, Recio A, Mick R, Clark CE, Carpenter EL, Fox KR, Demichele A, Schuchter LM, Leibowitz MS, Wexler MH, Vance BA, Beatty GL, Veloso E, Feldman MD, Vonderheide RH (2007) Telomerase-Specific T-Cell Immunity in Breast Cancer: Effect of Vaccination on Tumor Immunosurveillance. *Cancer Res*, 67 (21):10546-10555.
64. Dorr RT, Shipp NG, Liddil JD, Iyengar BS, Kunz KR, Remers WA (1992) Cardiotoxicity of mitomycin A, mitomycin C, and seven N7 analogs in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*, 31 (1): 1-5.
65. Dorvault L (1995) les Anoréxigènes. Edition Vigot. Paris, 124.
66. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3 (11): 991-998.
67. Ebelt K, Babaryka G, Figel AM, Pohla H, Buchner A, Stief CG, Eisenmenger W, Kirchner T, Schendel DJ, Noessner E (2008) Dominance of CD4(+) lymphocytic infiltrates with disturbed effector cell characteristics in the tumor microenvironment of prostate carcinoma. *Prostate*, 68 (1): 1-10.
68. Eguizabal C, Boyano MD, Diez-Torre A, Andrade R, Andollo N, De Felici M, Arechaga J (2007) Interleukin-2 induces the proliferation of mouse primordial germ cells in vitro. *Int J Dev Biol*, 51 (8):731-738.
69. Ehring GR, Kerschbaum HH, Fanger CM, Eder C, Rauer H, Cahalan MD (2000) Vanadate induces calcium signaling, Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel

activation, and gene expression in T lymphocytes and RBL-2H3 mast cells via thiol oxidation. *J Immunol*, 164 (2): 679-687.

70. Ekhart C, Kerst JM, Rodenhuis S, Beijnen JH, Huitema ADR (2008) Altered cyclophosphamide and thiotepa pharmacokinetics in a patient with moderate renal insufficiency. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1-5.

71. Everitt J, Griffin W (1995) Proposed IACUC Guidelines for the Review of Rodent Toxicology Studies. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 34 (3):72-74.

72. Fabien C, Bruzzoni-Giovanelli H (2003) Nouvelles cibles moléculaires dans les traitements des cancers. *Actualité chimique*, 12: 150-155.

73. Fagone P, Sriburi R, Ward-Chapman C, Frank M, Wang J, Gunter C, Brewer JW, Jackowski S (2007) Phospholipid biosynthesis program underlying membrane expansion during B-lymphocyte differentiation. *J Biol Chem*, 282 (10): 7591-7605.

74. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 339 (1):37-59.

75. FDA, Food and Drug Administration (1987) Good Laboratory practice regulations, Final rule. *Fed Reg*, 52: 33768- 33782.

76. Ferreira KS, Almeida SR, Ribeiro CH, Mariano M, Lopes JD (2003) Modulation of proliferation, differentiation and cytokine secretion of murine B-1b cells by proteins of the extracellular matrix. *Immunol Lett*, 86 (1):15-21.

77. Feun LG, Reddy KR, Scagnelli T, Yrizarry JM, Guerra JJ, Russell E, Schwartz M, Savaraj N, Livingstone AS, Levi JU, Jeffers LJ, Ardalan B (1999) une étude de Phase I de chemoembolization avec le cisplatine, Thiotépa, et lipiodol pour le primaire et le cancer métastatique du foie. *Am J Clin Oncol*, 22 (4) 375-380.

78. Figlin R, Pierce W, Kaboo R (1997) Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8+ selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J Urol*, 158: 740-745.
79. Flecknell PA (1994) Refinement of animal use - assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animals*, 28 (3):222-231.
80. Folch J, Lees M, Sloane- Stanley GH (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226: 497-509.
81. Foltz CJ, Ullman-Cullere M (1999) Guidelines for assessing the health and condition of mice. *Lab Animal*, 28 (4): 28-32.
82. Forget D (2004) Immunothérapie et cancer du sein. *Science*, 1-3.
83. Fujino Y, Mori M, Tamakoshi A, Sakauchi F, Suzuki S, Wakai K, Tokudome S, Yoshimura T (2008) A prospective study of educational background and breast cancer among Japanese women. *Cancer Causes Control*, [Epub ahead of print].
84. Fuse S, Zhang W, Usherwood EJ (2008) Control of memory CD8+ T cell differentiation by CD80/CD86-CD28 costimulation and restoration by IL-2 during the recall response. *J Immunol*, 180 (2):1148-1157.
85. Gao JQ, Okada N, Mayumi T, Nakagawa S (2007) Immune Cell Recruitment And Cell-Based System For Cancer Therapy. *Pharm Res*, 22: 786-803.
86. Gao Y, Tang W, Dai X, Gao H, Chen G, Ye J (2005) Effects of watersoluble ganoderma lucidum polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer. *Blood*, 106: 4225-4230.
87. Gerber M (2006) Is breast cancer a nutritional cancer? *Phytothérapie Springer*, 4 (1): 28-33.

88. Gillette RW (1987) Alternatives to pristane priming for ascitic fluid and monoclonal antibody production. *Journal of Immunological Methods*, 99:21-23.
89. Gir (2005) Guidance for industry and reviewers estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. *FAD*, 1-20.
90. Goppelt-Strube M, Resch K (1987) polyunsaturated fatty acids are enriched in the plasma membranes of mitogen-stimulated T-lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*, 904 (1): 22-28.
91. Grootenboers MJ, Schramel FM, Van Boven WJ, Van Putte BP, Hendriks JM, Van Schil PE (2007) Re-evaluation of toxicity and long-term follow-up of isolated lung perfusion with melphalan in patients with resectable pulmonary metastases: a phase I and extension trial. *Ann Thorac*, 83 (3):1235- 1236.
92. Guilbaud N, Kraus-Berthier L, Meyer-Losic F, Malivet V, Chacun C, Jan M, Tillequin F, Michel S, Koch M, Pfeiffer B, Atassi G, Hickman J, Pierré A (2001) Marked antitumor activity of a new potent acronycine derivative in orthotopic models of human solid tumors, *Clin Cancer Res*, 7 (8): 2573-2580.
93. Gupta S, Mahipal A (2007) Fatal pulmonary toxicity after a single dose of cyclophosphamide. *Pharmacotherapy*, (4):616-618.
94. Gupta S, Young T, Yel L, Su H, Gollapudi S (2007) Differential sensitivity of naïve and subsets of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Genes Immun*, 8(7):560-569.
95. Hadden JW (2003) Immunodeficiency and cancer: prospects for correction. *Int Immunopharmacol*, 3 (8):1061-1071.

96. Hamm TE (1995) Proposed institutional animal care and use committee guidelines for death as an endpoint in rodent studies. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 34 (3):69-71.
97. Hanessian S, Cantin LD (2000) The synthesis of enantiomerically pure disubstituted aziridines and N-alkoxy aziridines. *Tetrahedron Lett*, 41: 787-790.
98. Heiney SP, McWayne J, Cunningham JE, Hazlett LJ, Parrish RS, Bryant LH, Vitoc C, Jansen K (2007) Quality of life and lymphedema following breast cancer. *Lymphology*, 40 (4):177-184.
99. Hodge, Sterner (1943) Determination of substance acute toxicity by DL50. *American Industrial Hygien Association*, 10:93-99.
100. Hryniuk W, Bush H (1984) The importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2: 1281-1288.
101. Hu HM, Winter H, Urba WJ, Fox BA (2000) Divergent roles for CD4+ T cells in the priming and effector/ memory phases of adoptive immunotherapy. *J Immunol*, 165 (8): 4246-4253.
102. Huang D, Okada K, Komori C, Itoi E, Suzuki T (2004) Enhanced antitumor activity of ultrasonic irradiation in the presence of new quinolone antibiotics in vitro. *Cancer Sci*, 95 (10):845-849.
103. Humayoun AM, Begleiter A, Johnson D, William Lown J, McLaughlin L, Sim SK (1975) Studies Related to Antitumor Antibiotics. Part VI. Correlation of Covalent Cross-linking of DNA by Bifunctional Aziridinoquinones with their Antineoplastic Activity. *Can J Chem*, 53 (19): 2891-2905.
104. IRAC Interagency Research Animal Committee (1993) Recommendation on LD50 Testing. *ILAR News*, 35 (3-4):56-58.

105. Irvine DG, Reid KW, Hancock DS (1992) Quality assessment of external data: a further means of reducing animal use for toxicity testing a case study. *Quality Assurance: Good Practice, Regulation and Law*, 1(3):207-212.
106. Isnard-Bagnisa C , Bruno MB, Launay-Vachera V, Izzedinea H, Tostivinta I, Deray G (2005) Anticancer drug-induced nephrotoxicity. *Néphrologie*, 1: 101-114.
107. Iyer AP, Pishak SA, Sniezek MJ, Mastro AM (1984) Visualization of protein kinases in lymphocytes stimulated to proliferate with concanavalin A or inhibited with a phorbol ester. *Biochem Biophys Res Commun*, 121(1):392- 399.
108. Izraeli S, Adamson PC, Blaney SM, Balis FM (1994) Acute pancreatitis after ifosofamide therapy. *Cancer*, 74: 1627-1628.
109. Jiang JL, Peng YP, Qiu YH, Wang JJ (2007) Effect of endogenous catecholamines on apoptosis of Con A-activated lymphocytes of rats. *J Neuroimmunol*, 192 (1-2):79-88.
110. Joncker NT, Marloie MA, Chernysheva A , Lonchay C, Cuff J, Klijanienko B, Sigal-Zafrani, Vincent-Salomon A, Sastre X, Lantz O (2005) Antigen independent accumulation of activated effector/memory T lymphocytes into human and murine tumors. *Int J Cancer*, 118: 1205-1214.
111. Kamimura D, Bevan MJ (2007) Naive CD8+ T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo. *J Exp Med*, 204 (8):1803-1812.
112. Kato M, Watarai S, Nishikawa S, Iwasaki T, Kodama H (2007) A novel culture method of canine peripheral blood lymphocytes with concanavalin A and recombinant human interleukin-2 for adoptive immunotherapy. *J Vet Med Sci*, 69 (5): 481-486.

113. Khan NA, Hichami A (1999) Ionotropic 5-hydroxytryptamine type 3 receptor activates the protein kinase C-dependent phospholipase D pathway in human T-cells. *J Biochem*, 344 (Pt 1): 199-204.
114. Khandelia H, Ipsen JH, Mouritsen OG (2008) The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, [Epub ahead of print].
115. Khanna KM, McNamara JT, Lefrançois L (2007) in situ imaging of the endogenous CD8 T cell response to infection. *Science*, 318 (5847): 116-120.
116. Kiss L, Mangelinckx S, Fülöp F, De Kimpe N (2007) Convenient synthesis of trans-beta-amino carboxylic esters with an azetidino skeleton via rearrangement of beta, gamma-aziridino alpha-amino esters. *Org Lett*, 9 (21):4399-402.
117. Kjeldhal J (1983) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischem Korpon. *Anal Chem*, 22 (1883) 366 -38.
118. Knockaert M, Greengard P, Meijer L (2002) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci*, 23(9): 417-425.
119. Koide N, Morikawa A, Ito H, Sugiyama T, Hassan F, Shamima I, Tassan F, Mori I, Yoshida T, Yokochi T (2006) Defective responsiveness of CD5+ B1 cells to lipopolysaccharide in cytokine production. *J Endotoxin Res*, 12 (6): 346-351.
120. Koshiha S, Ichimiya S, Nagashima T, Tonooka A, Kubo T, Kikuchi T, Himi T, Sato N (2008) Tonsillar crypt epithelium of palmoplantar pustulosis secretes interleukin-6 to support B-cell development via p63/p73 transcription factors. *J Pathol*, 214 (1):75-84.
121. Koskinen K, Nevalainen S, Karikoski M, Hänninen A, Jalkanen S, Salmi M (2007) VAP-1-Deficient Mice Display Defects in Mucosal Immunity and

Antimicrobial Responses: Implications for Antiadhesive Applications. *J Immunol*, 179 (9):6160-6168.

122. Kowalczyk-Bronisz SH, Zabska R (1986) Studies on the derivatives of aziridine. I. Synthesis and immunopharmacological analysis of amides of alpha- aziridinyl beta-/p- chlorobenzoyl/- propionic acid. *Arch Immunol Ther Exp*, 34:333-350.

123. Krieger JN, Lee SW, Jeon J, Cheah PY, Liong ML, Riley DE (2008) Epidemiology of prostatitis. *J Antimicrob Agents*, 31 (1): 85-90.

124. Kuroi K, Sato Y, Yamaguchi Y, Toge T(1994) Modulation of suppressor cell activities by cyclophosphamide in breast cancer patients. *J Clin Lab Anal*, 8 (3):123-127.

125. Lahouel M, Boulkour S, Seguenib N, Fillastre JP (2004) Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*, 52 (6) : 314-322.

126. Lebrun C, Frenay M (2003) Chemotherapeutic neurotoxicity. *Rev. Neuro*, 159 (8-9): 741-754.

127. LePla RC, Landreau CA, Shipman M, Hartley JA, Jones GD (2005) Azinomycin inspired bisepoxides: influence of linker structure on in vitro cytotoxicity and DNA interstrand cross-linking. *Bioorg Med Chem Lett*, 15 (11): 2861-2864.

128. Levine BL (2008) T lymphocyte engineering ex vivo for cancer and infectious disease. *Expert Opin Biol Ther*, 8 (4):475-489.

129. Lewis RS, Cahalan MD (1989) Mitogen- induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T-cells. *Cell Regul*, 1 (1):99-112.

130. Li Q, Laval J, Ludlum DB (1997) Fpg protein releases a ring-opened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard. *Carcinogenesis*, 18 (5):1035-1038.
131. Liburdy RP (1994) Interactions entre cellules vivantes et champs électromagnétiques: preuves expérimentales des effets de ces champs sur la transduction des signaux et sur la prolifération cellulaire. Lawrence Berkeley Laboratory, University of California Berkeley, California, U.S.A, 1-2 P.
132. Lipnick RL, Cotruvo JA, Hill RN, Bruce RD, Stitzel KA, Walker A.P, Chu I, Goddard M, Segal L, Springer JA, Myers RC (1995) Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50 , and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd Chem Toxicol*, 33 (3): 223-231.
133. Lissoni P, Brivio F, Fumagalli L, Messina G, Ghezzi V, Frontini L, Giani L, Vaghi M, Ardizzoia A, Gardani GS (2004) Efficacy of cancer chemotherapy in relation to the pretreatment number of lymphocytes in patients with metastatic solid tumors. *Int J Biol Markers*, 19 (2):135-140.
134. Lissoni P, Fumagalli L, Brivio F, Rovelli F, Messina G, Di Fede G, Colciago M, Brera G (2006) Cancer chemotherapy-induced lymphocytosis: a revolutionary discovery in the medical oncology. *J Biol Regul Homeost Agents*, 20 (1-2): 29-35.
135. Loisel-Meyer S, Foley R, Medin JA (2008) Immuno-gene therapy approaches for cancer: from in vitro studies to clinical trials. *Front Biosci*, 13:3202-3214.
136. Lokiec F (2007) Ifosfamide: a chemotherapeutic agent with pharmacokinetic properties capable of preventing the cerebral metastasis of certain cancers. *Oncologie*, 9 (11): 790-794.

137. Longo R, D'Andrea MR, Sarmiento R, Salerno F, Gasparini G (2007) Integrated therapy of kidney cancer. *Ann Oncol*, 18: 41-48.
138. López JM, Cárdenas IE (1995) Hypocorticism due to selected deficiency of CRH with spontaneous resolution. A case report. *Rev Med Chil*, 123 (3):341-344.
139. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
140. Luzi L, Meneghini E, Oggionni S, Tambussi G, Piceni-Sereni L, Lazzarin A (2005) GH treatment reduces trunkal adiposity in HIV-infected patients with lipodystrophy: a randomized placebo-controlled study. *Eur J Endocrinol*, 153 (6): 781 - 789.
141. Macfarlane DP, Forbes S, Walker B (2008) Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol*, 197 (2):189-204.
142. Maes T, Wildiers H, Heye S, Demey W, Maleux G, Neven P, Van Oosterom AT, Paridaens R (2008) Intra-hepatic Mitomycin C bolus infusion in the treatment of extensive liver metastases of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 110 (1): 135-142.
143. Manser CE (1992) The assessment of stress in laboratory animals. Harsham (United Kingdom): RSPCA, 208 p.
144. Marchini S, Damia G, Brogginì M, Pennella G, Ripamonti M, Marsiglio A, Geroni C (2001) 4-demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyldaunorubicin (PNU-159548), a novel anticancer agent active against tumor cell lines with different resistance mechanisms. *Cancer Res*, 61:1991-1995.

145. Martinelli D, Chironna M, Tafuri S, Neve A, Caputi G, Prato R, Germinario C, Quarto M (2007) Epidemiology of HPV infections and cervical cancer in Apulia: a survey study and current data analysis. *Ann Ig*, 19 (6):499-508.
146. Marur S, Forastiere AA (2008) Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Clin Proc*, 83(4):489-501.
147. Massin F, Coudert B, Foucher P (1992) Le poumon des nitroso-urées. *Rev Mal Resp*, 9 : 575-582.
148. Mathews KA (1997) Evaluation de la douleur. In: cahier du Vetomecum. Forum de la douleur animale. Compte rendu des conferences du 22 Novembre 1997, congrès du CNVSPA-GEMI. Paris: Merial, 79-84.
149. Medjahed W, Tabet Zalta A, Kajima Mulengi J, Baba Ahmed FZ, Merzouk H (2004) The synthesis of n-acyl-2-hydroxymethyl aziridines of biological interest. *Tetrahedron Lett* 45:1211–1213.
150. Ménard C, Martin F, Apetoh L, Bouyer F, Ghiringhelli F (2008) Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*, [Epub ahead of print].
151. Morton DB, Griffiths PH (1985) Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*, 116 (16): 431-436.
152. Morton DB, Townsend P (1995) Dealing with Adverse Effects and Suffering during animal research. In: *Laboratory Animals - An Introduction for Experimenters*, 2nd Edn. (Ed. A.A. Tuffery), 215-231.

153. Morton DB (1997) Ethical and refinement aspects of animal experimentation. Socio-economic and ethical aspects. In: Veterinary Vaccinology (eds. Pastoret PP, Blancou J, Vannier P, Verschuereen C). Elsevier Science, 763-785.
154. Morton DB (2000) A systematic approach for establishing humane endpoints. *ILAR J*, 41(2): 80 -86.
155. Morton DB (2000) Self-consciousness and animal suffering. *Review Biology*, 47(2):77-80.
156. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous System control of food intake and body Weight. *Nature*, 443 (7109): 289-295.
157. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65:55-63.
158. Mueller P, Massner J, Jayachandran R, Combaluzier B, Albrecht I, Gatfield J, Blum C, Ceredig R, Rodewald HR, Rolink AG, Pieters J (2008) Regulation of T cell survival through coronin-1-mediated generation of inositol-1,4,5-trisphosphate and calcium mobilization after T cell receptor. *Nat Immunol*, 9 (4):424-431.
159. Murta EF, de Andrade JM, Falcão RP, Bighetti S (2000) Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori*, 86 (5): 403-407.
160. Musser SM, Pan SS, Egorin MJ, Kyle DJ, Callery PS (1992) Alkylation of DNA with aziridine produced during the hydrolysis of N,N',N''triethylenethiophosphoramidate. *Chem Res Toxicol*, 5 (1):95-99.

161. Nakano K, Saito K, Mine S, Matsushita S, Tanaka Y (2007) Engagement of CD44 up-regulates Fas ligand expression on T cells leading to activation-induced cell death. *Apoptosis*, 12 (1):45-54.
162. Navrozoglou I, Vrekoussis T, Kontostolis E, Dousias V, Zervoudis S, Stathopoulos EN, Zoras O, Paraskevaidis E (2008) Breast cancer during pregnancy: A mini-review. *Eur J Surg Oncol*, [Epub ahead of print].
163. Negrier S, Escudier B, Lasset C (1998) Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alpha- 2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *J Med*, 338:1272-1278.
164. Niks M, Otto M, Busová B, Stefanovic J (1990) Quantification of proliferative and suppressive responses of human T lymphocytes following ConA stimulation. *J Immunol Methods*, 126 (2):263-271.
165. Nonnecke BJ, Franklin ST, Nissen DJ (1991) Leucine and its catabolites alter mitogen- stimulated DNA synthesis by bovine lymphocytes. *J Nutr*, 121:1665–1672.
166. Nowell PC (1986) Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res*, 46: 2203-2207.
167. OCDE (2000) OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment, N° 19.
168. OCDE (2001) Étude de la toxicité pour le développement prénatal. Dans : Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. Organisation de coopération et de développement économiques, N° 414.

169. OCDE (2001) Guidance document on Acute Oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on testing and assessment, N° 24.
170. Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*, 41(1):66-97.
171. Okamoto A, Inaba T, Fujita N (2007) The role of interleukin-6 in a patient with polyclonal hairy B-cell lymphoproliferative disorder: a case report. *Lab Hematol*, 13 (4):124-127.
172. Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the comet assay. *Radiat Res*, 122: 86-94.
173. OMS (2006) Organisation mondiale de la santé. Thèmes de santé - Cancer.
174. Orsini JC (2003) Le comportement alimentaire. Collection Neurobiologie. GB Science Publisher. Paris, P 1-13.
175. Pallikkuth S, Wanchu A, Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M (2007) Human immunodeficiency virus (HIV) gag antigen-specific T-helper and granule-dependent CD8 T-cell activities in exposed but uninfected heterosexual partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *Clin Vaccine Immunol*, 14 (9):1196-1202.
176. Papaioannou N, Evans CA, Blank JT, Miller SJ (2001) Enantioselective synthesis of a MitoSane Core Assisted by Diversity-Based Catalyst Discovery. *Org Lett*, 3:2879-2882.
177. Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D (2001) Ex vivo analysis of tumor antigen specific CD8+ T cell responses using MHC/peptide tetramers in cancer patients. *Int Immunol pharmacol*, 1: 1235-1247.

178. Quezado ZM, Wilson WH, Cunnion RE, Parker MM, Reda D, Bryant G, Ognibene FP (1993) High-dose ifosfamide is associated with severe, reversible cardiac dysfunction. *Ann Intern Med*, 118 (1):31-36.
179. Rautou PE, Cazals-Hatem D, Durand F, Valla D (2007) Atteinte hépatique de l'anorexie mentale. *Hepato-Gastro J*, 14: 183-189.
180. Raynard B (2005) Drug-induced catabolism. *Nutr Clin Meta*, 19:25-29.
181. Reiche EM, Morimoto HK, Nunes SM (2005) Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development and progression of cancer. *Int Rev Psychiatry*, 17 (6):515-527.
182. Reickmann P, D'Allessandro F, Nordan RP, Fauci AS, Kehrl JH (1991) IL-6 and tumor necrosis factor- α autocrine and paracrine cytokines involved in B cell function. *J Immunol*, 146:3462-3470.
183. Remers WA, Iyengar BC (1995) Antitumor antibiotics. In: *Cancer Chemotherapeutic Agents* (Ed WOFoye), American Chemical Society, Washington DC, 584-592.
184. Revue de Presse, Novembre, 2006. *Cancer en Algérie*. Presse-dz.com
185. Rey J, Olive D, Sébahoun G, O'Callaghan T, Costello Régis T (2005) Les effecteurs cytotoxiques : données récentes. *Bulletin du Cancer*, 92 (11): 935-943.
186. Reynolds RC (1995) Aziridines. In: *Cancer Chemotherapeutic Agents* (Ed WOFoye), American Chemical Society, Washington DC, 186-197.
187. Ritz P, Sallé A, Couet C (2007) How can we explain weight stability following weight loss? *Revue Obésité*, 1(2-4):72-78.
188. Rivera-Nieves J, Kozaiwa K, Parrish CR, Berg CL (2000) Marked transaminase elevation in anorexia. *Dig Dis Sci*, 45 : 1959 - 1963.

189. Rongère V, Chalabi N, Delort L, Satih S, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ (2006) : Étude des acides gras poly-insaturés oméga 3 et oméga 6 sur l'expression des ARNm de BRCA1-Iris dans des cellules mammaires humaines en lignée continue par RT-PCR quantitative . Bull Cancer, 93: 122-128.
190. Ruetz S, Fabbro D, Zimmermann J, Meyer T, Gray N (2003) Chemical and biological profile of dual Cdk1 and Cdk2 inhibitors. Curr Med Chem Anticancer Agents, 3 (1): 1-14.
191. Runzi M, Layer P (1996) Drug associated pancreatitis facts and fictions. Pancreas, 13: 100-109.
192. Salem ML, Kadima AN, El-Naggar SA, Rubinstein MP, Chen Y, Gillanders WE, Cole DJ (2007) Defining the ability of cyclophosphamide preconditioning to enhance the antigen-specific CD8+ T-cell response to peptide vaccination: creation of a beneficial host microenvironment involving type I IFNs and myeloid cells. J Immunother, 30 (1):40-53.
193. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a Laboratory Manual. 2^e edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
194. Sanford J, Ewbank R (1986) Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals .Vet Rec, 118 (12): 334-338.
195. SCC (2006) Société Canadienne du Cancer/Institut National du cancer du Canada. Statistiques Canadiennes sur le Cancer. Canada ISSN: 0835-2976.
196. Schirmeister TJ (1999) New peptidic cysteine protease inhibitors derived from the electrophilic alpha-amine-acid aziridine-2, 3-dicarboxylic acid. J Med Chem, 42:560-572.
197. Schortgen F (2005) Néphrotoxicité et médicaments. Réanimation, 14: 436-441.

198. Shaked Y, Emmenegger U, Man S, Cervi D, Bertolini F, Ben-David Y, Kerbel RS (2005) Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. *Blood*, 106 (9):3058-3061.
199. Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175:184-191.
200. Singh RP, Agarwal R (2003) Tumour angiogenesis: a potential target in cancer control by phytochemicals. *Curr Cancer Drug Targets*, 3 (3):205-210.
201. Siwicki AK, Fuller JC, Nissen S, Morand M, Pozet F, Vincent F, Kazun B (2004) Effects of HMB (β -Hydroxy- β -Methylbutyrate) on in vitro proliferative responses of sheatfish (*Silurus glanis*) and catfish (*Ictalurus melas*) lymphocytes stimulated by mitogens. *Acta Vet (Brno)*, 73:119–122.
202. Siwicki AK, Mizak B (2001) In vitro influence of methisoprinol on lymphocyte proliferation in dogs. *Bull Vet Inst Pulawy*, 45:227–233.
203. Siwy M, Sek D, Kaczmarczyk B, Wietrzyk J, Nasulewicz A, Opolski A (2007) Synthesis and in vitro antiproliferative activity of new 1,3-(oxytetraethylenoxy)-cyclotriphosphazene derivatives. *Anticancer Res*, 27 (3B): 1553-1558.
204. Soothill JS, Morton DB, Ahmad A (1992) The HID50 (Hypothermia Inducing Dose 50): an alternative to the LD50 for the measurement of bacterial virulence. *International Journal of Experimental Pathology*, 75:95-98.
205. Sosson M, Malonga E, Niat G, Essomba R (1992) La rate traumatique. *Med Chir Dig*, 21: 75-77.

206. Srikrishnan T (1990) Structural studies of immunomodulators. Part 2: Crystal structure and conformation of azimexon (BM 12.531) an immunostimulant and an anti-tumor drug. *Anticancer Drug Des*, 5 (2):213-220.
207. Stagg J, Smyth MJ (2007) NK cell-based cancer immunotherapy. *Drug News Perspect*, 20:155-163.
208. Steingrims-dottir H, Gruber A, Björkholm M, Svensson A, Hansson M (2000) Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in relation to underlying disease, type of high-dose therapy and infectious complications. *Haematologica*, 85 (8):832-838.
209. Su YC, Rolph MS, Cooley MA, Sewell WA. (2006) Cyclophosphamide augments inflammation by reducing immunosuppression in a mouse model of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*, 117 (3):635-641.
210. Sutton VR, Waterhouse NJ, Browne KA, Sedelies K, Ciccone A, Anthony D, Koskinen A, Mullbacher A, Trapani JA (2007) Residual active granzyme B in cathepsin C-null lymphocytes is sufficient for perforin-dependent target cell apoptosis. *J Cell Biol*, 176 (4):425-433.
211. Tanaka Y, Koido S, Ohana M, Liu C, Gong J (2005) Induction of impaired antitumor immunity by fusion of MHC class II- deficient dendritic cells with tumor cells. *J Immunol*, 174 (3): 1274-1280.
212. Thiébaud AC, Chajès V, Clavel-Chapelon F, Gerber M (2005) Unsaturated fatty acids intake and breast cancer risk: epidemiological data review. *Bull Cancer*, 92 (7):658-659.

213. Toth LA (1997) The moribund state as an experimental endpoint. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 36 (3):44-48.
214. Tourani JM, Jaillon-Abraham C, Lucas V, Chretien Y, Mayeur D, Di Palma M, Boaziz C, Grise P, Varette C, Pavlovitch JM, Larregain D, Ecstein E, Untereiner M, Andrieu JM (1997) Traitement ambulatoire par interleukine 2 administrée par voie sous-cutanée chez des patients porteurs d'un cancer du rein métastatique. *Bulletin du cancer*, 84: 351-356.
215. Ullrich E, Chaput N, Zitvogel L (2008) Killer dendritic cells and their potential role in immunotherapy. *Horm Metab Res*, 40 (2):75-81.
216. Vainchtein LD, Rosing H, Mirejovsky D, Lenaz L, Schellens JH, Beijnen JH (2007) Stability experiments in human urine with EO9 (apaziquone): a novel anticancer agent for the intravesical treatment of bladder cancer. *J Pharm Biomed Anal*, 43 (1):285-292.
217. Valdiguié P (2000) *Biochimie clinique. Techniques et documentations*. Ed ISBN, 247-249.
218. Valette L, Croset M, Prigent AF, Meskini N, Lagarde M (1991) Dietary polyunsaturated fatty acids modulate fatty acid composition and early activation steps of concanavalin A-stimulated rat thymocytes. *J Nutr*, 121 (11): 1844-1859.
219. Van Kampen KR (1997) Immunotherapy and cytokines. *Semin Vet Med Surg*, 12:186-192.
220. Vedejs E, Naidu BN, Klapars A, Warner DL, Li VS, Na Y, Kohn H (2003) Synthetic Enantiopure Aziridinomitosenes: Preparation, Reactivity, and DNA Alkylation Studies. *J AM Chem Soc*, 125: 15796-15806.

221. Voloshchuk TP, Patskovskii IV, Potopal'skii AI (1999) Alkylation of nucleic acid components with ethylenimine and its derivatives. IV. Alkylation of homopolynucleotides and DNA. *Bioorg Khim*, 25 (6):464-473.
222. Wagner TL, Ahonen CL, Couture AM, Gibson SJ, Miller RL, Smith RM, Reiter MJ, Vaasilakos JP, Tomai MA (1999) Modulation of Th1 and Th2 cytokine production with the immune response modifiers R-848 and imiquimod. *Cell Immunol*, 191:10-18.
223. Wallace J, Sanford J, Smith MW (1990) The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. *Laboratory Animals*, 24 (2):97-130.
224. Walsky RL, Obach RS (2007) A comparison of 2-phenyl-2-(1-piperidinyl)propane (ppp), 1,1,1"-phosphinothioylidynetrisaziridine (thioTEPA), clopidogrel, and ticlopidine as selective inactivators of human cytochrome P450 2B6. *Drug Metab Dispos*, 35 (11):2053-2059.
225. Warner DL, Hibberd AM, Kalman M, Klapars A, Vedejs E (2007) N-Silyl Protecting Groups for Labile Aziridines: Application toward the Synthesis of N-H Aziridinomitosenes. *Cancer Immunol Immunother*, 32 (5):311-314.
226. Watanabe S, Suzuki H (2008) Changes of glucocorticoid receptor expression in the nasal polyps of patients with chronic sinusitis following treatment with glucocorticoid. *In Vivo*, 22 (1):37-42.
227. Williams G, Bring C, Cai XJ, Harrold A, King J, Liu XH (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav*, 74 (4-5):638-701.

228. Wong JP, Saravolac EG, Clement JG (1997) Development of a murine hypothermia model for study of respiratory tract influenza virus infection. *Laboratory Animal Science*, 47 (2):143-147.
229. Yanai H, Yoshida H, Tomono Y, Tada N (2008) Severe hypoglycemia in patients with anorexia. *Int Weight Disord*, 13: 1-3.
230. Zabska R, Kowalczyk-Bronisz SH (1987) Studies on the derivatives of aziridine. II. Synthesis and immunopharmacological analysis of substituted amides and amilides of alpha- aziridinyl beta-/p- chlorobenzoyl/- propionic acid. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 35 (5):681-691.
231. Zamzami N, Kroemer G (2003) Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization - The whole story? *Curr Biol*, 13 (2): 71-73.
232. Zeller G, Wandel E, Schwarting A (2003) Mitomycin-induced hemolytic-uremic syndrome *Dtsch Med Wochenschr*, 128 (25-26):1399-402.
233. Zimmermann M (1983) Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain*, 16:109-110.
234. Zver S, Zadnik V, Bunc M, Rogel P, Cernelc P, Kozelj M (2007) Cardiac toxicity of high-dose cyclophosphamide in patients with multiple myeloma undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*, 85 (5):408-414.

Isolement des lymphocytes

Préparation de la solution saline équilibrée

Solution A :

D-Glucose anhydre : 0.1% (1g/l)

CaCl₂ x 2H₂O: 5x10⁻⁵ M (7.40mg/l)

MgCl₂x6H₂O: 9.8 x10⁻⁴ M (0.2g/l)

KCl : 5.4x 10⁻³ M (0.40g/l)

Tris : 0.145 M (17.565g/l)

PH à 7.6

Solution B :

NaCl : 0.14 M (8.09 g/l)

Mélanger 1 volume de solution A avec 9 volumes de solution B

Test de transformation lymphoblastique (TTL)

Plaque d'incubation.

Les cultures sont réalisées en triple, sur des plaques ELISA

Dans chaque puit, 100µl de suspension cellulaire ($4 \cdot 10^5$ cellules / puit) sont déposés.

Par la suite, différents réactifs sont ajoutés sous un volume de 20µl:

Puit (0) : 100µl de suspension cellulaire + 100µl RPMI

Puit (1) : 100µl de suspension cellulaire + 20 µl ConA (5µg/ml) + 80µl RPMI

Puit (2) : 100µl de suspension cellulaire + 20 µl LPS (20 µg/ml) + 80µl RPMI

Puit (3, 4, 5, 6,7, 8) : 100µl de suspension cellulaire + 20 µl Aziridine (0µM -1µM-10µM-50µM-500µM-1mM) + 80µl RPMI

Puit (9, 10, 11, 12,13, 14) : 100µl de suspension cellulaire + 20 µl Aziridine (0µM -1µM-10µM-50µM-500µM-1mM) + 20 µl ConA (5µg/ml) + 60µl RPMI

Puit (15, 16, 17, 18,19, 20) : 100µl de suspension cellulaire + 20 µl Aziridine (0µM -1µM-10µM-50µM-500µM-1mM) + 20 µl LPS (20 µg/ml) + 60µl RPMI

Il est nécessaire de laisser pendant 30 mn avant d'ajouter la ConA ou la LPS à l'aziridine.

Les plaques sont mises à incuber à 37°C, 5 % CO₂ pendant 48 heures. A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées et serviront au comptage cellulaire, le dosage des protéines, des interleukines et la détermination de la composition en acide gras.

Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT

(Mosmann, 1983)

Tampon PBS

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 2.14\text{g}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 11.46\text{ g}$

$\text{NaCl} = 4.5\text{ g}$

$\text{NaN}_3 = 0.2\text{g}$

PH 7.5

Solution MTT à 5mg/ml de tampon PBS (MTT: [3-(4, 5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tétrazolium bromide])

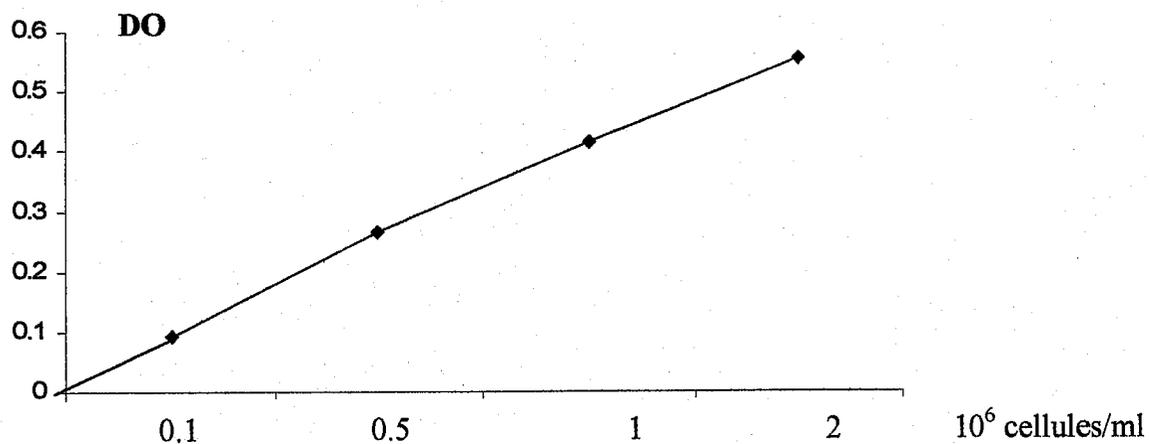
Préparation de la gamme étalon.

La gamme étalon est réalisée avec quatre suspensions cellulaires : S1 : $2 \cdot 10^6$ cellules /ml ; S2 : $1 \cdot 10^6$ cellules /ml (d 1/2) ; S3 : $0.5 \cdot 10^6$ cellules /ml (d 1/2) ; S4 : $0.1 \cdot 10^6$ cellules /ml (d 1/5).

100 μl de chaque dilution (S1, S2, S3, S4), sont ajoutées à 10 μl de MTT à un volume final de 200 μl (complété avec le milieu RPMI).

Après incubation au bain-marie à 37° C pendant 3 heures, la lecture au spectrophotomètre à 630 nm est effectuée après l'ajout de HCL à 0.04 M dans l'isopropanol à un volume final de 1ml.

Nombre des cellules 10^6 cellules/ml	DO
$S_1 = 2$	0.55
$S_2 = 1$	0.41
$S_3 = 0,5$	0.26
$S_4 = 0,1$	0.09



Courbe d'étalonnage par la méthode du MTT

Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Principe : L'électrophorèse en gel d'agarose est la méthode de choix pour la séparation, la purification et l'identification des fragments d'ADN et d'ARN. Sous l'influence d'un courant électrique, les acides nucléiques chargés négativement se déplacent à travers le gel d'agarose vers l'électrode positive.

Solutions :

- Gel d'agarose (Référence. 13914)
- Tampon TBE (Tris borate EDTA) pH 8,3

Tris.HCl [tris (hydroxyméthyl)aminométhane] 90 mmol.L⁻¹ : 10,89 g

Acide borique 90 mmol.L⁻¹ : 5,56 g

EDTA 2 mmol.L⁻¹ : 0,74 g (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique). Compléter à 1 litre avec l'eau distillée.

- Tampon TE (Tris EDTA) pH 7,6
Tris.HCl [tris (hydroxyméthyl)aminométhane] 1 mol.L⁻¹ : 12,1 g
EDTA (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique)
0,1 mol.L⁻¹ : 3,72 g. Compléter à 100 ml avec l'eau distillée.
- Colorant de charge pH 8
Bleu de bromophénol 3 mmol.L⁻¹ : 0,2 g
Saccharose 1,5 mol.L⁻¹ : 5,1 g
Tris. HCl 10 mmol.L⁻¹ : 0,01 g
Compléter à 10 ml avec l'eau distillée.
- Solution de coloration pour les gels
Solution stock : Dissoudre 10 mg de bleu de Nile (Sigma, ref H 5632) dans 5 mL d'eau distillée.
- Solution de coloration : 1 mL de la solution stock pour 100 mL d'eau distillée.
- Solution de coloration pour le test Comète : 1g Acridine orange dans 100ml H₂O distillée (1%).
- Solution de décoloration pour le test Comète :
Ethanol 3700 ml
H₂O 1300ml

Protocole expérimental:

L'agarose est mélangée avec le tampon TBE (0,8 g d'agarose pour 100 mL de tampon), fondu au four.

Le gel est coulé, en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne placé dans la cuve d'électrophorèse. Démouler le gel en enlevant le peigne

Placer le portoir à gel dans la cuve et aligner les puits du côté de la cathode.

Remplir la cuve de tampon TBE.

Verser le tampon dans la cuve à électrophorèse, le gel doit être complètement recouvert ainsi que les puits.

Placer les solutions d'ADN (conservée dans le tampon TE), préalablement mélangé avec le colorant de charge, dans chacun des 5 puits :

Puit1 : ADN seul ; puit 2 : ADN avec aziridine 1 ; puit 3 : ADN avec aziridine 2 ; puit 4 : ADN avec aziridine 3 ; puit 5 : ADN avec aziridine 4.

Après la migration 55 min à 100 V, le gel est immergé dans le colorant pendant 20 min. Après rinçage et révélation, les bandes d'ADN sont Photographiés avec un appareil numérique.

Pour le test de Comète : Après migration, le gel est couvert de la solution acridine orange (1%) pendant 15min. Après rinçage, la solution décolorante est ajoutée pendant 2min.

La lecture se fait au microscope à fluorescence avec analyseur d'images relié à un ordinateur dont le logiciel « Comète ADCIS » sert à détecter et analyser les Comètes.

Tableau A1 : Prolifération des lymphocytes stimulés par la ConA ou par la LPS (nombre de cellules x 10⁵/puit) en présence et en absence de l'aziridine 1 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins (10 ⁵ cellules/puit)	Femmes Cancéreuses (10 ⁵ cellules/puit)
ConA		
Basal	5.70 ± 0.80 ^f	5.03 ± 0.53 ^f
ConA	26.97 ± 2.52 ^e	17.26 ± 0.46 ^{f*}
1 μM aziridine1	8.60 ± 0.55 ^e	6.97 ± 0.78 ^{e*}
ConA + 1 μM aziridine1	28.40 ± 1.70 ^e	20.77 ± 0.68 ^{e*}
10 μM aziridine1	12.60 ± 0.91 ^d	8.77 ± 0.57 ^{d*}
ConA + 10 μM aziridine1	35.80 ± 2.82 ^d	21.43 ± 0.68 ^{d*}
50 μM aziridine1	18.70 ± 0.74 ^c	9.24 ± 0.31 ^{c*}
ConA + 50 μM aziridine1	43 ± 2.93 ^c	27.32 ± 1.58 ^{c*}
500 μM aziridine1	25.70 ± 1.40 ^b	10.40 ± 0.34 ^{b*}
ConA + 500 μM aziridine1	50 ± 1.84 ^b	29.34 ± 1.35 ^{b*}
1 mM aziridine1	28.90 ± 1.62 ^a	12.58 ± 0.84 ^{a*}
ConA + 1 mM aziridine1	58.80 ± 2.71 ^a	32.30 ± 1.25 ^{a*}
LPS		
Basal	5.70 ± 0.80 ^f	5.03 ± 0.53 ^f
LPS	28 ± 1.83 ^f	16.71 ± 0.28 ^{f*}
1 μM aziridine1	7.90 ± 0.54 ^e	6.97 ± 0.78 ^e
LPS + 1 μM aziridine1	30 ± 1.80 ^e	18.71 ± 0.95 ^{e*}
10 μM aziridine1	14 ± 1.12 ^d	8.77 ± 0.57 ^{d*}
LPS + 10 μM aziridine1	38 ± 2.51 ^d	20.56 ± 0.50 ^{d*}
50 μM aziridine1	20 ± 1.33 ^c	9.24 ± 0.31 ^{c*}
LPS + 50 μM aziridine1	46 ± 2.92 ^c	28.11 ± 0.42 ^{c*}
500 μM aziridine1	27 ± 1.40 ^b	10.40 ± 0.34 ^{b*}
LPS + 500 μM aziridine1	53.90 ± 2.21 ^b	29 ± 0.78 ^{b*}
1 mM aziridine1	29.70 ± 1.53 ^a	12.58 ± 0.65 ^{a*}
LPS + 1 mM aziridine1	58 ± 2.10 ^a	30.54 ± 1.25 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

^{a, b, c, d, e, f} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P < 0,05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* P < 0,05).

Tableau A 2 : Indice de prolifération des lymphocytes stimulés par la ConA ou par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 1 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins	Femmes Cancéreuses
ConA		
Basal	0.60 ± 0.13 ^e	0.54 ± 0.15 ^d
ConA	3.37 ± 0.27 ^f	2.15 ± 0.21 ^{d*}
1 μM aziridine1	0.96 ± 0.33 ^d	0.78 ± 0.23 ^{c*}
ConA + 1 μM aziridine1	3.70 ± 0.29 ^e	2.70 ± 0.44 ^{c*}
10 μM aziridine1	1.37 ± 0.28 ^c	0.93 ± 0.30 ^{b*}
ConA + 10 μM aziridine1	4.50 ± 0.42 ^d	2.69 ± 0.24 ^{c*}
50 μM aziridine1	1.92 ± 0.38 ^b	0.95 ± 0.34 ^{b*}
ConA + 50 μM aziridine1	5.35 ± 0.12 ^c	3.40 ± 0.12 ^{b*}
500 μM aziridine1	2.75 ± 0.31 ^a	1.11 ± 0.36 ^{a*}
ConA + 500 μM aziridine1	6.08 ± 0.40 ^b	3.56 ± 0.5 ^{a*}
1 mM aziridine1	2.84 ± 0.60 ^a	1.24 ± 0.40 ^{a*}
ConA + 1 mM aziridine1	7.12 ± 0.92 ^a	3.93 ± 0.83 ^{a*}
LPS		
Basal	0.60 ± 0.10 ^f	0.54 ± 0.15 ^d
LPS	3.67 ± 0.27 ^f	2.19 ± 0.21 ^{c*}
1 μM aziridine1	0.95 ± 0.33 ^e	0.78 ± 0.13 ^c
LPS + 1 μM aziridine1	3.95 ± 0.21 ^e	2.46 ± 0.25 ^{b*}
10 μM aziridine1	1.49 ± 0.28 ^d	0.93 ± 0.30 ^{b*}
LPS + 10 μM aziridine1	4.75 ± 0.40 ^d	2.57 ± 0.25 ^{b*}
50 μM aziridine1	1.97 ± 0.36 ^c	0.95 ± 0.34 ^{b*}
LPS + 50 μM aziridine1	5.75 ± 0.52 ^c	3.51 ± 0.12 ^{a*}
500 μM aziridine1	2.88 ± 0.32 ^b	1.11 ± 0.36 ^{a*}
LPS + 500 μM aziridine1	6.64 ± 0.15 ^b	3.57 ± 0.12 ^{a*}
1 mM aziridine1	3.13 ± 0.24 ^a	1.24 ± 0.40 ^{a*}
LPS + 1 mM aziridine1	7.04 ± 0.15 ^a	3.71 ± 1.25 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. L'indice de prolifération correspond au rapport de la densité optique des cellules stimulées sur la densité optique des cellules non stimulées. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P < 0,05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* P < 0.05).

Tableau A3 : Prolifération des lymphocytes stimulés par la ConA ou par la LPS (nombre de cellules x 10⁵/puit) en présence et en absence de l'aziridine 2 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins (10 ⁵ cellules/puit)	Femmes Cancéreuses (10 ⁵ cellules/puit)
ConA		
Basal	5.70 ±0.80	5.03 ±0.53 ^a
ConA	26.97±2.5 ^a	17.26±0.46 ^{a*}
1µM aziridine2	5±0.65	3.83±0,28 ^{b*}
ConA +1µM aziridine 2	19.97±1.8 ^b	10.2±0.26 ^{b*}
10µM aziridine 2	4.80±0.92	3.06±0.25 ^{b*}
ConA +10µM aziridine 2	16.80±1.8 ^c	7.94±0.64 ^{c*}
50µM aziridine 2	4.70±0.72	2.66±0,53 ^{b*}
ConA +50µM aziridine 2	12±1.11 ^d	7.29±0.29 ^{c*}
500µM aziridine 2	4.5±0.64	1.96±0,54 ^{c*}
ConA +500µM aziridine 2	9.5±1.28 ^e	6.03±0.21 ^{d*}
1mM aziridine 2	4.3±0.75	1.6±0.17 ^{c*}
ConA +1mM aziridine2	6.5±0.67 ^f	5.84±1.25 ^d
LPS		
Basal	5.7 ±0,80	5.03±0.53 ^a
LPS	28±1.8 ^a	16.71±0.28 ^{a*}
1µM aziridine 2	5.3±1.50	3.83±0.29 ^{b*}
LPS +1µM aziridine 2	20±3.38 ^b	9.48±2.44 ^{b*}
10µM aziridine 2	5±1.75	3.06±0.34 ^{b*}
LPS +10µM aziridine 2	17±2.35 ^c	7.96±2.65 ^{c*}
50µM aziridine 2	4.8±1.64	2.66±0.51 ^{b*}
LPS +50µM aziridine 2	14±2.29 ^d	7.32±1.33 ^{c*}
500µM aziridine 2	4.5±1.56	1.96±0.54 ^{c*}
LPS +500µM aziridine 2	10.4±2.12 ^e	6.69±0.34 ^{d*}
1mM aziridine 2	4.5±0.65	1.6±0.17 ^{c*}
LPS+1mM aziridine 2	6.9±1.37 ^f	6.12±1.25 ^d

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

^{a, b, c, d, e, f} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P< 0,05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* P< 0.05).

Tableau A 4 : Indice de prolifération des lymphocytes stimulés par la ConA ou par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 2 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins	Femmes Cancéreuses
ConA		
Basal	0.60 ±0.13	0.54±0.15 ^a
ConA	3.37±0.27 ^a	2.15±0.21 ^{a*}
1µM aziridine 2	0.56±0.13	0.43±0.13 ^{b*}
ConA +1µM aziridine 2	2.60±0.22 ^b	1.28±0.11 ^{b*}
10µM aziridine 2	0.49±0.18	0.32±0.09 ^{c*}
ConA +10µM aziridine 2	2.11±0.24 ^c	0.99±0.14 ^{c*}
50µM aziridine 2	0.49±0.18	0.27±0.08 ^{d*}
ConA +50µM aziridine 2	1.49±0.12 ^d	0.9±0.12 ^{c*}
500µM aziridine 2	0.46±0.13	0.21±0.04 ^{d*}
ConA +500µM aziridine 2	1.15±0.10 ^e	0.73±0.14 ^{d*}
1mM aziridine 2	0.48±0.10	0.15±0.04 ^{e*}
ConA +1mM aziridine 2	0.78±0.15 ^f	0.71±0.06 ^d
LPS		
Basal	0.6 0±0.10	0.54±0.15 ^a
LPS	3.67±0.27 ^a	2.19±0.21 ^{a*}
1µM aziridine 2	0.64±0.23	0.43±0.13 ^b
LPS +1µM aziridine 2	2.63±0.12 ^b	1.24±0.15 ^{b*}
10µM aziridine 2	0.53±0.38	0.32±0.09 ^{c*}
LPS +10µM aziridine 2	2.12±0.25 ^c	0.99±0.15 ^{c*}
50µM aziridine 2	0.47±0.16	0.27±0.08 ^{d*}
LPS +50µM aziridine 2	1.75±0.52 ^d	0.91±0.09 ^{c*}
500µM aziridine 2	0.48±0.12	0.21±0.04 ^{d*}
LPS +500µM aziridine 2	1.28±0.25 ^e	0.82±0.07 ^{d*}
1mM aziridine 2	0.47±0.19	0.15±0.02 ^{e*}
LPS+1mM aziridine 2	0.83±0.24 ^f	0.74±0.11 ^d

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. L'indice de prolifération correspond au rapport de la densité optique des cellules stimulées sur la densité optique des cellules non stimulées. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

^{a, b, c, d, e, f} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P< 0,05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* P< 0.05).

Tableau A5 : Prolifération des lymphocytes stimulés par la ConA ou par la LPS (nombre de cellules x 10⁵/puit) en présence et en absence de l'aziridine 3 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins (10 ⁵ cellules/puit)	Femmes Cancéreuses (10 ⁵ cellules/puit)
ConA		
Basal	5.70 ± 0.80 ^f	5.03 ± 0.53 ^e
ConA	26.97 ± 2.52 ^f	17.26 ± 1.46 ^{e*}
1 μM aziridine 3	10.4 ± 0.15 ^e	6.55 ± 0.58 ^{d*}
ConA + 1 μM aziridine 3	32 ± 3.54 ^e	19.04 ± 2.68 ^{d*}
10 μM aziridine 3	15.7 ± 2.91 ^d	9.52 ± 1.45 ^{c*}
ConA + 10 μM aziridine 3	38.9 ± 4.82 ^d	23.4 ± 3.68 ^{c*}
50 μM aziridine 3	20 ± 3.74 ^c	11.08 ± 2.33 ^{b*}
ConA + 50 μM aziridine 3	46.9 ± 3.93 ^c	24.63 ± 2.55 ^{c*}
500 μM aziridine 3	28 ± 2.41 ^b	12.47 ± 1.34 ^{a*}
ConA + 500 μM aziridine 3	55.9 ± 3.82 ^b	27.93 ± 3.35 ^{b*}
1 mM aziridine 3	32 ± 3.16 ^a	13.54 ± 2.84 ^{a*}
ConA + 1 mM aziridine 3	63.5 ± 2.71 ^a	29.65 ± 2.37 ^{a*}
LPS		
Basal	5.7 ± 0.80 ^f	5.03 ± 0.53 ^f
LPS	28 ± 1.83 ^f	16.71 ± 0.28 ^{f*}
1 μM aziridine 3	9 ± 0.54 ^e	6.55 ± 0.58 ^{e*}
LPS + 1 μM aziridine 3	30 ± 2.80 ^e	18.96 ± 1.95 ^{e*}
10 μM aziridine 3	17.5 ± 2.12 ^d	9.52 ± 0.57 ^{d*}
LPS + 10 μM aziridine 3	40 ± 3.47 ^d	20.3 ± 2.35 ^{d*}
50 μM aziridine 3	25.3 ± 2.33 ^c	11.08 ± 0.33 ^{c*}
LPS + 50 μM aziridine 3	48.9 ± 2.98 ^c	26.11 ± 0.54 ^{c*}
500 μM aziridine 3	30 ± 1.98 ^b	12.47 ± 0.44 ^{b*}
LPS + 500 μM aziridine 3	56.8 ± 2.29 ^b	28.09 ± 1.78 ^{b*}
1 mM aziridine 3	37 ± 2.83 ^a	13.54 ± 1.65 ^{a*}
LPS + 1 mM aziridine 3	60 ± 3.54 ^a	33.84 ± 2.25 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P < 0,05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* P < 0,05).

Tableau A 6 : Indice de prolifération des lymphocytes stimulés par la ConA ou par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 3 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins	Femmes Cancéreuses
ConA		
Basal	0.60 ± 0.13 ^e	0.54 ± 0.15 ^d
ConA	3.37 ± 0.27 ^f	2.15 ± 0.21 ^{e*}
1 µM aziridine 3	1.17 ± 0.13 ^d	0.73 ± 0.16 ^{c*}
ConA + 1 µM aziridine 3	4.17 ± 0.29 ^e	2.48 ± 0.21 ^{d*}
10 µM aziridine 3	1.67 ± 0.18 ^c	1.01 ± 0.13 ^{b*}
ConA + 10 µM aziridine 3	4.89 ± 0.42 ^d	3.05 ± 0.25 ^{c*}
50 µM aziridine 3	2.06 ± 0.18 ^b	1.14 ± 0.24 ^{a*}
ConA + 50 µM aziridine 3	5.84 ± 0.12 ^c	3.06 ± 0.12 ^{c*}
500 µM aziridine 3	3 ± 0.32 ^a	1.13 ± 0.36 ^{a*}
ConA + 500 µM aziridine 3	6.8 ± 0.10 ^b	3.39 ± 0.15 ^{b*}
1 mM aziridine 3	3.15 ± 0.36 ^a	1.34 ± 0.25 ^{a*}
ConA + 1 mM aziridine 3	7.69 ± 0.4 ^a	3.59 ± 0.63 ^{a*}
LPS		
Basal	0.60 ± 0.10 ^f	0.54 ± 0.15 ^d
LPS	3.67 ± 0.27 ^f	2.19 ± 0.21 ^{f*}
1 µM aziridine 3	1.09 ± 0.23 ^e	0.73 ± 0.16 ^{c*}
LPS + 1 µM aziridine 3	3.95 ± 0.21 ^e	2.49 ± 0.12 ^{e*}
10 µM aziridine 3	1.87 ± 0.38 ^d	1.01 ± 0.13 ^{b*}
LPS + 10 µM aziridine 3	5 ± 0.35 ^d	2.53 ± 0.24 ^{d*}
50 µM aziridine 3	2.5 ± 0.16 ^c	1.14 ± 0.22 ^{a*}
LPS + 50 µM aziridine 3	6.12 ± 0.42 ^c	3.26 ± 0.76 ^{c*}
500 µM aziridine 3	3.2 ± 0.52 ^b	1.33 ± 0.14 ^{a*}
LPS + 500 µM aziridine 3	7 ± 0.45 ^b	3.46 ± 0.24 ^{b*}
1 mM aziridine 3	3.9 ± 0.16 ^a	1.34 ± 0.25 ^{a*}
LPS + 1 mM aziridine 3	7.27 ± 0.33 ^a	4.11 ± 0.16 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. L'indice de prolifération correspond au rapport de la densité optique des cellules stimulées sur la densité optique des cellules non stimulées. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P < 0,05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* P < 0.05).

Tableau A 7 : Prolifération des lymphocytes stimulés par la ConA ou par la LPS (nombre de cellules x 10⁵/puit) en présence et en absence de l'aziridine 4 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins (10 ⁵ cellules/puit)	Femmes Cancéreuses (10 ⁵ cellules/puit)
ConA		
Basal	5.70 ± 0.80 ^f	5.03 ± 0.53 ^f
ConA	26.97 ± 2.5 ^f	17.26 ± 0.46 ^{e*}
1 μM aziridine 4	8 ± 1.65 ^e	5.32 ± 0.33 ^{e*}
ConA + 1 μM aziridine 4	29 ± 1.58 ^e	15.96 ± 1.4 ^{e*}
10 μM aziridine 4	15.7 ± 1.12 ^d	7.06 ± 0.84 ^{d*}
ConA + 10 μM aziridine 4	38.9 ± 1.83 ^d	18.52 ± 1.32 ^{d*}
50 μM aziridine 4	23 ± 3.54 ^c	9.24 ± 0.45 ^{c*}
ConA + 50 μM aziridine 4	46.9 ± 3.54 ^c	27.05 ± 1.8 ^{c*}
500 μM aziridine 4	28 ± 1.64 ^b	11.5 ± 1.25 ^{b*}
ConA + 500 μM aziridine 4	55.9 ± 2.28 ^b	30 ± 1.1 ^{b*}
1 mM aziridine 4	35 ± 1.75 ^a	12.78 ± 1.02 ^{a*}
ConA + 1 mM aziridine 4	63.5 ± 2.67 ^a	34.42 ± 1.35 ^{a*}
LPS		
Basal	5.7 ± 0.80 ^f	5.03 ± 0.53 ^f
LPS	28 ± 1.8 ^f	16.71 ± 0.28 ^{e*}
1 μM aziridine 4	8 ± 1.65 ^e	5.32 ± 0.33 ^{e*}
LPS + 1 μM aziridine 4	30 ± 1.82 ^e	14.83 ± 1.8 ^{e*}
10 μM aziridine 4	15.7 ± 1.12 ^d	7.06 ± 0.84 ^{d*}
LPS + 10 μM aziridine 4	40 ± 2.4 ^d	18.05 ± 1.12 ^{d*}
50 μM aziridine 4	23 ± 1.54 ^c	9.24 ± 0.45 ^{c*}
LPS + 50 μM aziridine 4	48.9 ± 1.75 ^c	28.11 ± 1.52 ^{c*}
500 μM aziridine 4	28 ± 1.64 ^b	11.5 ± 1.25 ^{b*}
LPS + 500 μM aziridine 4	56.8 ± 1.94 ^b	29.34 ± 1.35 ^{b*}
1 mM aziridine 4	35 ± 1.75 ^a	12.78 ± 1.02 ^{a*}
LPS + 1 mM aziridine 4	63.5 ± 2.67 ^a	31.33 ± 1.25 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P < 0,05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* P < 0.05).

Tableau A 8 : Indice de prolifération des lymphocytes stimulés par la ConA ou par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 4 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins	Femmes Cancéreuses
ConA		
Basal	0.4 ± 0.07 ^f	0.54 ± 0.15 ^c
ConA	3.37 ± 0.27 ^f	2.15 ± 0.21 ^{e*}
1 μM aziridine 4	0.9 ± 0.14 ^e	0.59 ± 0.13 ^{c*}
ConA + 1 μM aziridine 4	3.78 ± 0.18 ^e	2.08 ± 0.21 ^{e*}
10 μM aziridine 4	1.67 ± 0.10 ^d	0.75 ± 0.19 ^{b*}
ConA + 10 μM aziridine 4	4.89 ± 1.15 ^d	2.32 ± 0.25 ^{d*}
50 μM aziridine 4	2.37 ± 0.09 ^c	0.84 ± 0.19 ^{b*}
ConA + 50 μM aziridine 4	5.84 ± 0.15 ^c	3.36 ± 0.12 ^{c*}
500 μM aziridine 4	3 ± 0.04 ^b	1.23 ± 0.24 ^{a*}
ConA + 500 μM aziridine 4	6.8 ± 0.78 ^b	3.64 ± 0.14 ^{b*}
1 mM aziridine 4	3.45 ± 0.15 ^a	1.25 ± 0.34 ^{a*}
ConA + 1 mM aziridine 4	7.69 ± 0.25 ^a	4.16 ± 0.4 ^{a*}
LPS		
Basal	0.4 ± 0.07 ^f	0.54 ± 0.15 ^c
LPS	3.67 ± 0.40 ^f	2.19 ± 0.20 ^{c*}
1 μM aziridine 4	0.85 ± 0.05 ^e	0.59 ± 0.09 ^{c*}
LPS + 1 μM aziridine 4	3.95 ± 0.08 ^e	1.95 ± 0.15 ^{d*}
10 μM aziridine 4	1.87 ± 0.10 ^d	0.75 ± 0.14 ^{b*}
LPS + 10 μM aziridine 4	5 ± 0.15 ^d	2.25 ± 0.09 ^{c*}
50 μM aziridine 4	2.5 ± 0.14 ^c	0.84 ± 0.18 ^{b*}
LPS + 50 μM aziridine 4	6.12 ± 0.52 ^c	3.51 ± 0.19 ^{b*}
500 μM aziridine 4	3.2 ± 0.63 ^b	1.23 ± 0.4 ^{a*}
LPS + 500 μM aziridine 4	7 ± 0.27 ^b	3.61 ± 0.87 ^{a*}
1 mM aziridine 4	3.9 ± 0.15 ^a	1.25 ± 0.32 ^{a*}
LPS + 1 mM aziridine 4	8.3 ± 0.25 ^a	3.8 ± 0.31 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. La prolifération des lymphocytes est déterminée par comptage cellulaire et par la méthode MTT. L'indice de prolifération correspond au rapport de la densité optique des cellules stimulées sur la densité optique des cellules non stimulées. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

^{a, b, c, d, e, f} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (P < 0,05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* P < 0.05).

Tableau A 9 : Teneurs en protéines totales des lymphocytes stimulés par la ConA et par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 1 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins ($\mu\text{g/ puit}$)	Femmes Cancéreuses ($\mu\text{g/ puit}$)
ConA		
Basal	35 \pm 3.6 ^f	28.26 \pm 1.53 ^f
ConA	280 \pm 28.7 ^f	169.26 \pm 2.66 ^{f*}
1 μM aziridine1	53.80 \pm 3.85 ^e	37.15 \pm 2.54 ^{e*}
ConA + 1 μM aziridine1	293.84 \pm 29.05 ^e	202.68 \pm 24.25 ^{e*}
10 μM aziridine1	78.36 \pm 2.87 ^d	47.27 \pm 3.02 ^{d*}
ConA + 10 μM aziridine1	353.67 \pm 31.25 ^d	212.25 \pm 30.65 ^{d*}
50 μM aziridine1	117.82 \pm 3.54 ^c	50.91 \pm 4.25 ^{c*}
ConA + 50 μM aziridine1	423.94 \pm 32.10 ^c	264.97 \pm 36.25 ^{c*}
500 μM aziridine1	157.80 \pm 4.28 ^b	59.43 \pm 3.42 ^{b*}
ConA + 500 μM aziridine1	520.09 \pm 24.51 ^b	277.72 \pm 28.97 ^{b*}
1mM aziridine1	178.15 \pm 4.10 ^a	71.67 \pm 3.41 ^{a*}
ConA + 1mM aziridine1	612.45 \pm 34.65 ^a	310.84 \pm 32.65 ^{a*}
LPS		
Basal	35 \pm 3.6 ^f	28.26 \pm 1.53 ^f
LPS	286 \pm 27.80 ^f	165 \pm 2.68 ^{e*}
1 μM aziridine1	47.50 \pm 2.54 ^e	37.15 \pm 2.54 ^{e*}
LPS + 1 μM aziridine1	304.42 \pm 28.80 ^e	182.74 \pm 3.95 ^{d*}
10 μM aziridine1	86.25 \pm 4.12 ^d	47.27 \pm 3.02 ^{d*}
LPS + 10 μM aziridine1	385.14 \pm 22.71 ^d	201.06 \pm 10.50 ^{c*}
50 μM aziridine1	124.80 \pm 3.33 ^c	50.91 \pm 4.25 ^{c*}
LPS + 50 μM aziridine1	456.85 \pm 34.58 ^c	274.56 \pm 13.42 ^{b*}
500 μM aziridine1	166 \pm 3.54 ^b	59.43 \pm 3.42 ^{b*}
LPS + 500 μM aziridine1	547.55 \pm 27.21 ^b	266 \pm 20.78 ^{b*}
1mM aziridine1	180.36 \pm 4.53 ^a	68.47 \pm 3.49 ^{a*}
LPS + 1mM aziridine1	584.42 \pm 37.36 ^a	300.56 \pm 31.25 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. ^{a, b, c, d, e, f} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* $P < 0,05$).

Tableau A 10 : Teneurs en protéines totales des lymphocytes stimulés par la ConA et par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 2 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins ($\mu\text{g/ puit}$)	Femmes Cancéreuses ($\mu\text{g/ puit}$)
ConA		
Basal	35 \pm 3.60 ^a	28.26 \pm 1.53 ^a
ConA	280 \pm 28.7 ^a	169.26 \pm 2.66 ^{a*}
1 μM aziridine 2	30 \pm 3.62 ^a	24.65 \pm 1.28 ^{a*}
ConA + 1 μM aziridine 2	200.32 \pm 18.51 ^b	98.02 \pm 0.26 ^{b*}
10 μM aziridine 2	27.45 \pm 1.72 ^a	19.92 \pm 1.25 ^{b*}
ConA + 10 μM aziridine 2	169.41 \pm 2.84 ^c	75.86 \pm 2.64 ^{c*}
50 μM aziridine 2	25.97 \pm 1.52 ^b	16.56 \pm 1.32 ^{c*}
ConA + 50 μM aziridine 2	123.82 \pm 3.11 ^d	69.48 \pm 2.29 ^{d*}
500 μM aziridine 2	23.40 \pm 3.25 ^b	13.63 \pm 1.54 ^{d*}
ConA + 500 μM aziridine 2	96.62 \pm 3.58 ^e	55.13 \pm 2.42 ^{e*}
1 mM aziridine 2	21.63 \pm 2.75 ^b	10.13 \pm 1.17 ^{e*}
ConA + 1 mM aziridine 2	64.48 \pm 3.67 ^f	54.26 \pm 2.25 ^{e*}
LPS		
Basal	35 \pm 3.6 ^a	28.26 \pm 1.53 ^a
LPS	286 \pm 27.80 ^a	165 \pm 2.68 ^{a*}
1 μM aziridine 2	31.54 \pm 1.40 ^a	20.51 \pm 1.29 ^{a*}
LPS + 1 μM aziridine 2	200.28 \pm 3.36 ^b	92.68 \pm 3.44 ^{b*}
10 μM aziridine 2	30 \pm 1.25 ^a	15.19 \pm 1.24 ^{b*}
LPS + 10 μM aziridine 2	170.54 \pm 3.35 ^c	78.47 \pm 3.65 ^{c*}
50 μM aziridine 2	25.97 \pm 1.52 ^b	13.94 \pm 1.51 ^{b*}
LPS + 50 μM aziridine 2	139 \pm 3.90 ^d	71.14 \pm 2.53 ^{d*}
500 μM aziridine 2	23.40 \pm 3.25 ^b	10.06 \pm 1.65 ^{c*}
LPS + 500 μM aziridine 2	102.22 \pm 3.12 ^e	64.76 \pm 2.34 ^{d*}
1 mM aziridine 2	23.40 \pm 2.65 ^b	8.45 \pm 0.96 ^{c*}
LPS + 1 mM aziridine 2	66.47 \pm 3.7 ^f	60.25 \pm 2.35 ^{e*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. ^{a, b, c, d, e, f} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* $P < 0,05$).

Tableau A 11: Teneurs en protéines totales des lymphocytes stimulés par la ConA et par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 3 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins ($\mu\text{g/ puit}$)	Femmes Cancéreuses ($\mu\text{g/ puit}$)
ConA		
Basal	35 \pm 3.6 ^f	28.26 \pm 1.53 ^f
ConA	280 \pm 28.7 ^f	169.26 \pm 2.66 ^{f*}
1 μM aziridine 3	61.85 \pm 3.15 ^e	35.79 \pm 1.58 ^{e*}
ConA + 1 μM aziridine 3	331.24 \pm 10.54 ^e	184.71 \pm 3.68 ^{e*}
10 μM aziridine 3	94.40 \pm 3.91 ^d	51.48 \pm 1.65 ^{d*}
ConA + 10 μM aziridine 3	400.85 \pm 3.82 ^d	227.47 \pm 3.81 ^{d*}
50 μM aziridine 3	120.80 \pm 3.41 ^c	60.25 \pm 1.33 ^{c*}
ConA + 50 μM aziridine 3	483.91 \pm 2.93 ^c	240.53 \pm 3.45 ^{c*}
500 μM aziridine 3	170.87 \pm 3.41 ^b	67.58 \pm 2.40 ^{b*}
ConA + 500 μM aziridine 3	584.34 \pm 3.82 ^b	274.89 \pm 2.35 ^{b*}
1 mM aziridine 3	196.49 \pm 2.16 ^a	74.07 \pm 3.84 ^{a*}
ConA + 1 mM aziridine 3	652.25 \pm 3.41 ^a	289.76 \pm 3.47 ^{a*}
LPS		
Basal	35 \pm 3.6 ^f	28.26 \pm 1.53 ^f
LPS	286 \pm 27.80 ^f	165 \pm 2.68 ^{f*}
1 μM aziridine 3	53.26 \pm 1.44 ^e	35.79 \pm 1.58 ^{e*}
LPS + 1 μM aziridine 3	301.45 \pm 3.80 ^e	183.26 \pm 2.54 ^{e*}
10 μM aziridine 3	102.45 \pm 3.52 ^d	51.48 \pm 1.65 ^{d*}
LPS + 10 μM aziridine 3	410 \pm 2.47 ^d	197.43 \pm 3.35 ^{d*}
50 μM aziridine 3	153.35 \pm 3.33 ^c	60.25 \pm 1.33 ^{c*}
LPS + 50 μM aziridine 3	485.47 \pm 4.98 ^c	246.73 \pm 2.54 ^{c*}
500 μM aziridine 3	180.21 \pm 2.98 ^b	67.58 \pm 2.40 ^{b*}
LPS + 500 μM aziridine 3	575.17 \pm 3.49 ^b	277.34 \pm 2.38 ^{b*}
1 mM aziridine 3	224.14 \pm 3.53 ^a	74.07 \pm 3.84 ^{a*}
LPS + 1 mM aziridine 3	610.35 \pm 2.64 ^a	331.14 \pm 3.50 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. ^{a, b, c, d, e, f} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* $P < 0,05$).

Tableau A12 : Teneurs en protéines totales des lymphocytes stimulés par la ConA et par la LPS en présence et en absence de l'aziridine 4 chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins ($\mu\text{g}/\text{puit}$)	Femmes Cancéreuses ($\mu\text{g}/\text{puit}$)
ConA		
Basal	38 \pm 4.90 ^f	28.26 \pm 1.53 ^e
ConA	320 \pm 38.50 ^e	169.26 \pm 2.66 ^{f*}
1 μM aziridine 4	72.16 \pm 2.54 ^e	29.88 \pm 1.33 ^{e*}
ConA + 1 μM aziridine 4	434.92 \pm 3.87 ^d	200.21 \pm 2.4 ^{e*}
10 μM aziridine 4	142.24 \pm 3.54 ^d	40.66 \pm 2.40 ^{d*}
ConA + 10 μM aziridine 4	444.54 \pm 3.64 ^d	214.35 \pm 2.24 ^{d*}
50 μM aziridine 4	230.21 \pm 3.14 ^c	52.69 \pm 2.45 ^{c*}
ConA + 50 μM aziridine 4	551.47 \pm 4.54 ^c	247.26 \pm 3.8 ^{c*}
500 μM aziridine 4	257.58 \pm 4.25 ^b	64.61 \pm 3.25 ^{b*}
ConA + 500 μM aziridine 4	660.25 \pm 3.28 ^b	280.19 \pm 2.36 ^{b*}
1 mM aziridine 4	355.45 \pm 2.85 ^a	71.80 \pm 3.25 ^{a*}
ConA + 1 mM aziridine 4	750.42 \pm 3.36 ^a	335.39 \pm 2.40 ^{a*}
LPS		
Basal	38 \pm 4.90 ^f	28.26 \pm 1.53 ^e
LPS	328 \pm 1.8 ^{f3}	165 \pm 2.68 ^{f*}
1 μM aziridine 4	72.16 \pm 2.54 ^e	29.88 \pm 1.33 ^{e*}
LPS + 1 μM aziridine 4	448.05 \pm 3.82 ^e	175.43 \pm 1.38 ^{e*}
10 μM aziridine 4	142.24 \pm 3.54 ^d	40.66 \pm 2.40 ^{d*}
LPS + 10 μM aziridine 4	458.57 \pm 3.04 ^d	196.23 \pm 2.20 ^{d*}
50 μM aziridine 4	230.21 \pm 3.14 ^c	52.69 \pm 2.45 ^{c*}
LPS + 50 μM aziridine 4	560.48 \pm 2.75 ^c	260.56 \pm 2.12 ^{c*}
500 μM aziridine 4	257.58 \pm 4.25 ^b	64.61 \pm 3.25 ^{b*}
LPS + 500 μM aziridine 4	653.08 \pm 3.94 ^b	284.47 \pm 2.35 ^{b*}
1 mM aziridine 4	355.45 \pm 2.85 ^a	71.80 \pm 3.25 ^{a*}
LPS + 1 mM aziridine 4	797.08 \pm 3.70 ^a	310.33 \pm 2.54 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET des incubations réalisées en triples chez 10 témoins et 10 patientes cancéreuses.. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. ^{a, b, c, d, e, f} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les femmes cancéreuses (* $P < 0,05$).

Tableau A13 : Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes T et d'interleukines 6 (IL-6) par les lymphocytes B activés et incubés en présence de l'aziridine 1, chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins	Femmes Cancéreuses
IL-2 (pg/ml)		
Basal	860.55 ± 46.18 ^e	612.34± 65.87 ^{e*}
ConA	6724.2± 332.10 ^d	4329.28± 249.89 ^{d*}
ConA +50µM aziridine 1	7956± 298 ^c	5052.83± 344.7 ^{c*}
Con A+ 500µM aziridine 1	8120.24± 279.32 ^b	6240.15± 244.62 ^{b*}
ConA + 1mM aziridine 1	8566.42± 323.71 ^a	7007.58± 260.02 ^{a*}
IL-6 (pg/ml)		
Basal	144.30 ± 60 ^d	140.58± 47 ^e
LPS	9767.12± 303 ^c	5728.87± 254.6 ^{d*}
LPS +50µM aziridine 1	9887.62± 414 ^b	6040.20± 400 ^{c*}
LPS+ 500µM aziridine 1	9979.33± 398 ^b	7369.21± 358 ^{b*}
LPS + 1mM aziridine 1	10111.2± 876.22 ^a	8324.08± 475 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ±ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes témoins et 10 femmes cancéreuses. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0.05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les cancéreuses ($p < 0.05$). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

Tableau A14 : Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes T d'interleukines 6 (IL-6) par les lymphocytes B activés et incubés en présence de l'aziridine 2, chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins	Femmes Cancéreuses
IL-2 (pg/ml)		
Basal	860.55 ± 46.18 ^c	612.34 ± 65.87 ^{c*}
ConA	6724.2 ± 332.10 ^a	4329.28 ± 249.89 ^{a*}
ConA + 50µM aziridine 2	970 ± 59 ^b	584.27 ± 69.58 ^{c*}
Con A+ 500µM aziridine 2	975 ± 62 ^b	620.89 ± 78 ^{c*}
ConA + 1mM aziridine 2	986.32 ± 49.22 ^b	882.17 ± 98.65 ^{b*}
IL-6 (pg/ml)		
Basal	144.30 ± 60 ^c	140.58 ± 47 ^c
LPS	9767.12 ± 303 ^a	5728.87 ± 254.6 ^{a*}
LPS + 50µM aziridine 2	211.7 ± 96.8 ^b	112.68 ± 67 ^{c*}
LPS+ 500µM aziridine 2	230.1 ± 89 ^b	149.95 ± 58 ^{c*}
LPS + 1mM aziridine 2	297 ± 68.77 ^b	266.42 ± 98 ^b

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ±ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes témoins et 10 femmes cancéreuses. ^{a, b, c, d, e} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0.05$) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les cancéreuses ($p < 0.05$). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

Tableau A15 : Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes T et d'interleukines 6 (IL-6) par les lymphocytes B activés et incubés en présence de l'aziridine 3, chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins	Femmes Cancéreuses
IL-2 (pg/ml)		
Basal	860.55 ± 46.18 ^o	612.34± 65.87 ^{c*}
ConA	6724.20± 332.10 ^b	4329.28± 249.89 ^{d*}
ConA +50µM aziridine 3	9178.632± 254.53 ^a	5020.29± 278.55 ^{c*}
Con A+ 500µM aziridine 3	9346.18± 349.66 ^a	6669.23± 357.21 ^{b*}
ConA + 1mM aziridine 3	9487.612± 349.55 ^a	7830.42± 300,25 ^{a*}
IL-6 (pg/ml)		
Basal	144.30 ± 60 ^o	140.58± 47 ^d
LPS	9767.12± 303 ^b	5728.87± 254.6 ^{c*}
LPS+50µM aziridine 3	9986.31± 308.46 ^b	6023.55± 300.6 ^{c*}
LPS+ 500µM aziridine3	10214.58± 949.16 ^a	7092.26± 978.14 ^{b*}
LPS + 1mM aziridine 3	10457.38± 898.83 ^a	7789.45± 876.54 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ±ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes témoins et 10 femmes cancéreuses. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0.05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les cancéreuses (p< 0.05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

Tableau A16: Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes T et d'interleukines 6 (IL-6) par les lymphocytes B activés et incubés en présence de l'aziridine 4, chez les témoins et chez les femmes cancéreuses.

	Femmes Témoins	Femmes Cancéreuses
IL-2 (pg/ml)		
Basal	848.98 ± 66.18 ^e	612.34 ± 65.87 ^{e*}
ConA	5875.92 ± 252.67 ^d	4329.28 ± 249.89 ^{d*}
ConA + 50µM aziridine 4	7286.32 ± 354.83 ^c	5202.45 ± 321.25 ^{c*}
Con A+ 500µM aziridine 4	8146.18 ± 249.66 ^b	5987.06 ± 278.77 ^{b*}
ConA + 1mM aziridine 4	9016.12 ± 259.51 ^a	6887.16 ± 250.65 ^{a*}
IL-6 (pg/ml)		
Basal	165.30 ± 44.89 ^e	140.58 ± 47 ^{d*}
LPS	7717.12 ± 315.53 ^d	5728.87 ± 254.6 ^{c*}
LPS + 50µM aziridine 4	8346.31 ± 308.45 ^c	6004.57 ± 300.54 ^{c*}
LPSA+ 500µM aziridine 4	11214,58 ± 749,64 ^b	7398.87 ± 705.44 ^{b*}
LPS + 1mM aziridine 4	12857,45 ± 695,37 ^a	8299.55 ± 624.36 ^{a*}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ±ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes témoins et 10 femmes cancéreuses. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p < 0.05) dans le même groupe. * indique différence significative entre les témoins et les cancéreuses (p < 0.05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

Tableau A17 : Composition en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T en présence de l'aziridine 3, à 1mM (en % pondéraux des AG totaux).

	Femmes Témoins				Femmes Cancéreuses			
	Sans ConA	ConA	Aziridine 3	Aziridine3+ ConA	Sans ConA	ConA	Aziridine3	Aziridine3+ ConA
16 :0	31.65±0.88	30.15±0.24*	30.85±2.52	29.63±1.35	30.65±0.50	29.67±0.98*	30.94±1.52	29.85±0.98
16 :1	6.11±0.62	6.23±0.80	7.15±0.73	7.58±0.89	6.04±0.51	6.55±0.70	6.87±0.54	6.62±0.15
18 :0	20.08±0.98	18.73±1.07*	19.58±1.17	18.34±1.50	19.98±0.98	17.72±0.94*	18.68±1.40	17±1.15
18 :1	13.89±1.06	19.98±1.14*	13.45±2.58	18.79±1.24	13.33±1.07	19.52±1.20*	14.04±0.68	17.24±1.18
18 :2n-6	9.66±0.87	11.09±1.32	8.97±0.83	10.72±0.90	9.87±0.52	10.38±0.71	9.13±0.54	9.66±0.33
20 :4n-6	13.85±1.06	10.02±0.62*	13.03±1.25	11.52±1.10	13.04±1.63	10.37±0.88*	12.25±1.25	10.88±1.10
20 :5n-3	1.99±0.25	1.54±0.15*	1.9±0.13	1.72±0.11	1.92±1.02	1.42±0.98*	1.93±0.68	1.82±0.68
22 :6n-3	2.67±0.12	1.92±0.11*	2.82±0.15	1.15±0.30	2.48±0.12	1.06±0.11*	2.98±0.15	1.2±0.31
AGS	51.73±1.14	48.88±1.64*	50.43±1.99	47.97±1.72	50.63±2.02	47.39±2.23*	49.62±2.66	46.85±3.12
AGMI	20±1.24	26.21±1.35*	20.6±1.50	26.37±1.02	19.37±1.70	26.07±1.91*	20.91±1.02	23.86±1.02 ^{\$}
AGPI	28.17±1.21	24.57±1.98*	26.72±2.82	25.11±2.55	27.31±2.24	23.23±3.10*	26.29±2.98	23.56±1.65
P/S	0.54±0.02	0.50±0.02*	0.53±0.03	0.52±0.04	0.53±0.01	0.49±0.02*	0.53±0.01	0.50 ±0.02

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 femmes témoins et 10 femmes cancéreuses. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

- ConA ou aziridine comparé à sans ConA : * P < 0,05.
- Aziridine + Con A comparé à Con A : \$ P < 0,05.

Tableau A18 : Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 1) durant les 14 jours d'observation.

Aziridine 1	Poids corporels		
	J ₀	J ₇	J ₁₄
Témoins	200.08 ± 8.38 ^c	260 ± 10.52 ^b	320 ± 9.55 ^a
Dose 1 6.5 mg/kg	203.2 ± 14.84 ^c	258.9 ± 8.41 ^b	299.4 ± 10.88 ^a
Dose 2 26 mg/kg	209.12 ± 9.41 ^a	210.5 ± 8.40 ^{*a}	207 ± 1.45 ^{**a}
Dose 3 65 mg/kg	201 ± 12.29 ^a	154.24 ± 9.24 ^{**b}	136.7 ± 1.45 ^{**c}
Dose 4 97.5 mg/kg	200.57 ± 2.16 ^a	126 ± 5.63 ^{**b}	Rats morts
Dose 5 130 mg/kg	203 ± 7.20	Rats morts	Rats morts

J₀: poids initial ; J₇: poids après une semaine ; J₁₄: poids après 2 semaines.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de variance.

* P<0.05 ; ** P <0.01.

Dans chaque lot, la classification des moyennes, en fonction du temps, est effectuée par le test rang multiple de Duncan, après analyse de variance. Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (P<0.05).

Tableau A19: Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 2) durant les 14 jours d'observation.

Aziridine 2	Poids corporels		
	J ₀	J ₇	J ₁₄
Témoins	200.08 ± 8.38 ^c	260 ± 10.52 ^b	320 ± 9.55 ^a
Dose 1 6.85 mg/kg	204 ± 9.43 ^c	256.45 ± 10.40 ^b	306 ± 10.62 ^a
Dose 2 27.4 mg/kg	197.2 ± 8.50 ^a	196.7 ± 7.42 ^{*a}	188 ± 10.56 ^{*a}
Dose 3 68.5 mg/kg	200 ± 13.40 ^a	158 ± 14.63 ^{**b}	147.5 ± 6.80 ^{**b}
Dose 4 102.75 mg/kg	210 ± 7.44 ^a	145 ± 8.56 ^{**b}	Rats morts
Dose 5 137 mg/kg	202.35 ± 11.55	Rats morts	Rats morts

J₀: poids initial ; J₇: poids après une semaine ; J₁₄: poids après 2 semaines.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de variance.

* P<0.05 ; ** P <0.01.

Dans chaque lot, la classification des moyennes, en fonction du temps, est effectuée par le test rang multiple de Duncan, après analyse de variance. Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (P<0.05).

Tableau A20: Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 3) durant les 14 jours d'observation.

Aziridine 3	Poids corporels		
	J ₀	J ₇	J ₁₄
Témoins	200.08 ± 8.38 ^c	260 ± 10.52 ^b	320 ± 9.55 ^a
Dose 1 8.75 mg/kg	196.14 ± 13.4 ^c	246.40 ± 8.44 ^b	314.54 ± 12.47 ^a
Dose 2 35 mg/kg	210 ± 9.76 ^b	207 ± 15.92 ^{b*}	245 ± 10.64 ^{a**}
Dose 3 87.5 mg/kg	209.58 ± 8.66 ^a	198.40 ± 7.34 ^{*a}	200 ± 10.33 ^{**a}
Dose 4 131.25 mg/kg	207.68 ± 10.42 ^a	163.8 ± 6.50 ^{**b}	129.74 ± 7.68 ^{**c}
Dose 5 175 mg/kg	200.36 ± 6.54	Rats morts	Rats morts

J₀: poids initial ; J₇: poids après une semaine ; J₁₄: poids après 2 semaines.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de variance.

* P<0.05 ; ** P <0.01.

Dans chaque lot, la classification des moyennes, en fonction du temps, est effectuée par le test rang multiple de Duncan, après analyse de variance. Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (P<0.05).

Tableau A21: Evolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine 4) durant les 14 jours d'observation

	Poids corporels		
	J ₀	J ₇	J ₁₄
Témoins	200.08 ± 8.38 ^c	260 ± 10.52 ^b	320 ± 9.55 ^a
Dose 1 9.35 mg/kg	203.20 ± 6.34 ^c	265 ± 7.46 ^b	318 ± 7.22 ^a
Dose 2 37.4 mg/kg	205.36 ± 8.45 ^b	208 ± 9.75 ^{b*}	220 ± 8.45 ^{a**}
Dose 3 93.5 mg/kg	200 ± 11.53 ^a	200.36 ± 8.31 ^{*a}	207.54 ± 8.13 ^{*a}
Dose 4 140.25 mg/kg	201.5 ± 9.78 ^a	145.6 ± 7.46 ^{**b}	131.4 ± 8.24 ^{**c}
Dose 5 187 mg/kg	200.25 ± 6.67	Rats morts	Rats morts

J₀: poids initial ; J₇: poids après une semaine ; J₁₄: poids après 2 semaines.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de variance.

* P<0.05 ; ** P <0.01.

Dans chaque lot, la classification des moyennes, en fonction du temps, est effectuée par le test rang multiple de Duncan, après analyse de variance. Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (P<0.05).

Tableau A22: Evolution de la croissance relative (%) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

Croissance relative journalière (%)	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Semaine 1</u>				
Témoins	30±1.21	30±1.21	30±1.21	30±1.21
Dose 1	27.50±1.50	25.71±2.42	25.62±2.49	30.41±1.65
Dose 2	0.66±0.07**	- 0.25±0.03**	-1.42± 0.05**	1.28±0.14**
Dose3	-23.26±1.12***	-21±1.02***	- 5.33±0.32***	0.18±0.02**
Dose 4	- 37.18±1.08***	- 30.9±1.10***	-21.12±0.94***	- 27.74±1.42***
<u>Semaine 2</u>				
Témoins	23± 0.96	23±0.96	23± 0.96	23±0.96
Dose 1	15.64±1.30**	27.65±1.24	27.65±1.13	20 ±1.30
Dose 2	- 1.40± 0.98***	-4.42± 0.76***	18.35±1.01**	5.76 ±1.16**
Dose3	- 11.37±1.05***	- 6.64± 0.80***	0.8± 0.04***	3.58±1.02***
Dose 4	Rats morts	Rats morts	- 20.79± 1,12***	- 9.75±1.40***

Poids final- Poids initial

Croissance relative = ----- x100

Poids initial

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 4:** 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001

Tableau A23: Consommation alimentaire (g/j/rat) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

g/j/rat	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Semaine 1</u>				
Témoins	18±2	18±2	18±2	18±2
Dose 1	16.66±1.75	15.53±2.10	17.50±1.75	18±1.63
Dose 2	12±2.06*	11.63±1.14*	18.11±1.08	17.04±1.05
Dose3	10±1.35*	9.15± 0.98**	12.45±1.01*	13.76±1.14*
Dose 4	6±1.14**	7.11±0.67**	10.33±1.03**	8.24±1.01**
<u>Semaine 2</u>				
Témoins	25.30± 1.67	25.30±1.67	25.30±1.67	25.30±1.67
Dose 1	23±2.14	23.64±1.11	24±1.08	24.62 ±1.52
Dose 2	17.42± 1.58*	18± 1.34*	21.48±1.56	22±1.36
Dose3	8±1.06**	9± 1.05**	18.37± 1.11*	19.04±1.22*
Dose 4	Rats morts	Rats morts	10.14± 0.98**	9.66±0.95**

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 4:** 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A 24: Ingestion d'eau (ml/j/rat) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

ml/j/rat	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Semaine 1</u>				
Témoins	34±2.45	34±2.45	34±2.45	34±2.45
Dose 1	30±1.13	29.56±1.60	31.50±1.50	33.89±1.60
Dose 2	25±1.67*	23.26±1.27*	29.74±1.17	30.23±1.12
Dose3	20±1.38*	18± 1.09**	24.07±1.21*	26.52±1.24*
Dose 4	13.50±1.11**	14.02±1.01**	21±1.33*	15.54±1.10**
<u>Semaine 2</u>				
Témoins	47.5± 1.76	47.5± 1.76	47.5± 1.76	47.5± 1.76
Dose 1	40±1.50	40.56±1.85	41.60±1.28	42.80 ±1.40
Dose 2	28.73± 1.15*	29.54± 1.24*	35.74±1.50	34.28±1.02
Dose3	18.54±1.07**	20± 1.35**	32.42± 1.16*	30.06±1.22*
Dose 4	Rats morts	Rats morts	20± 1.08**	17.32±1.01**

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 4:** 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A25: Quantité de fèces excrétés (g/j/rat) par les rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

g/j/rat	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Semaine 1</u>				
Témoins	3.6±0.88	3.6±0.88	3.6±0.88	3.6±0.88
Dose 1	3.28±0.76	3.10±0.60	3.5±0.56	3.6±0.63
Dose 2	2.48±0.52*	2.32±0.47*	3.62±0.38	3.4±0.52
Dose3	2.02±0.50*	1.83± 0.53**	2.49±0.41*	2.75±0.87*
Dose 4	1.23±0.42**	1.42±0.61**	2.06±0.85*	1.64±0.75**
<u>Semaine 2</u>				
Témoins	5.06± 0.75	5.06± 0.75	5.06± 0.75	5.06± 0.75
Dose 1	4.85±0.63	4.72±0.52	4.8±0.80	4.92 ±0.64
Dose 2	3.48± 0.44*	3.6± 0.44*	4.29±0.50	4.4±0.50
Dose3	1.62±0.38**	1.8± 0.50**	3.67± 0.66*	3.8±0.34*
Dose 4	Rats morts	Rats morts	2.02± 0.58**	1.93±0.31**

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 4:** 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A26: Volume d'urine (ml/j/rat) éliminé par les rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation.

ml/j/rat	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Semaine 1</u>				
Témoins	15.61±1.06	15.61±1.06	15.61±1.06	15.61±1.06
Dose 1	14.73±0.95	14.38±0.60	14.69±0.56	15.9±0.62
Dose 2	11.64±0.73*	10.8±0.37*	10.02±0.28*	12 ±0.72*
Dose3	9.33±0.42*	8.48± 0.23**	10.9±0.51*	10.02±0.37*
Dose 4	6.44±0.45**	7.02±0.50**	7.82±0.35*	7.73±0.50**
<u>Semaine 2</u>				
Témoins	19.67± 1.11	19.67±1.11	19.67±1.1	19.67± 1.11
Dose 1	18±1.07	18.36±1.05	18.87±1.08	18.05 ±0.34
Dose 2	12± 0.93*	9.8± 0.24*	13.76±0.69*	12.37±0.50*
Dose3	6.79±0.42**	7.85± 0.50**	11.87± 0.60*	11.45±0.24*
Dose 4	Rats morts	Rats morts	6.78± 0.52**	6.34±0.31**

Dose1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4. **Dose 4:** 97.5mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A27: Valeurs moyennes des globules blancs, globules rouges et d'hémoglobine chez les rats témoins et expérimentaux.

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Globules blancs/ 10³ mm³</u>				
Témoins	3.45 ± 0.03	3.45 ± 0.03	3.45 ± 0.03	3.45 ± 0.03
Dose 1	3.54 ± 0.07	3.33 ± 0.09	3.99 ± 1.05	4.05 ± 1.57
Dose 2	4.05 ± 0.80*	3.28 ± 0.04*	4.49 ± 0.90*	4.66 ± 1.27*
Dose 3	6.67 ± 0.07**	3.24 ± 0.06**	7.10 ± 1.02**	6.13 ± 0.80**
Dose 4	/	/	8.19 ± 0.57**	6.68 ± 0.64**
<u>Globules rouges/ 10⁶ mm³</u>				
Témoins	6.26 ± 0.06	6.26 ± 0.06	6.26 ± 0.06	6.26 ± 0.06
Dose 1	6.11 ± 0.07	6.22 ± 0.05	6 ± 0.08	6.13 ± 0.09
Dose 2	5.74 ± 0.83*	6.01 ± 0.01*	5.66 ± 0.05*	5.57 ± 0.06*
Dose 3	4.49 ± 0.03**	5.74 ± 0.06**	5.29 ± 0.06**	5.09 ± 0.04**
Dose 4	/	/	4.07 ± 0.03**	4.43 ± 0.02**
<u>Hémoglobine mg/dl</u>				
Témoins	12.03 ± 0.1	12.03 ± 0.1	12.03 ± 0.1	12.03 ± 0.1
Dose 1	11.81 ± 0.6	11.58 ± 0.5	11.85 ± 0.7	11.87 ± 0.5
Dose 2	9.86 ± 0.3*	10.05 ± 0.13*	10.56 ± 0.17*	10.06 ± 0.11*
Dose 3	7.67 ± 0.24**	8.09 ± 0.4**	9.32 ± 0.07**	8.91 ± 0.12**
Dose 4	/	/	7.88 ± 0.03**	7.34 ± 0.24**

Dose 1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine 3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 4:** 97.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A 28: Valeurs moyennes des lipides sériques (cholestérol total CT, triglycérides TG et phospholipides PL) chez les rats témoins et expérimentaux.

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>CT (mmol/l)</u>				
Témoins	2.1 ± 0.10	2.1 ± 0.10	2.1 ± 0.10	2.1 ± 0.10
Dose 1	2.27 ± 0.17	2.25 ± 0.49	2.3 ± 0.15	2.28 ± 0.67
Dose 2	1.65 ± 0.12*	1.52 ± 0.54*	1.71 ± 0.50*	1.5 ± 0.27*
Dose 3	1.3 ± 0.05**	1.27 ± 0.04**	1.4 ± 0.02**	1.35 ± 0.05**
Dose 4	/	/	1.12 ± 0.07**	1 ± 0.04**
<u>TG (mmol/l)</u>				
Témoins	0.9 ± 0.16	0.9 ± 0.16	0.9 ± 0.16	0.9 ± 0.16
Dose 1	1 ± 0.27	1.09 ± 0.25	1.07 ± 0.24	1.12 ± 0.24
Dose 2	0.64 ± 0.03*	0.58 ± 0.01*	0.62 ± 0.05*	0.57 ± 0.06*
Dose 3	0.4 ± 0.03**	0.42 ± 0.06**	0.44 ± 0.01**	0.4 ± 0.04**
Dose 4	/	/	0.38 ± 0.03**	0.35 ± 0.02**
<u>PL (mmol/l)</u>				
Témoins	1.25 ± 0.11	1.25 ± 0.11	1.25 ± 0.11	1.25 ± 0.11
Dose 1	1.18 ± 0.40	1.22 ± 0.35	1.2 ± 0.67	1.14 ± 0.05
Dose 2	0.98 ± 0.13*	0.9 ± 0.23*	0.93 ± 0.70*	0.87 ± 0.51*
Dose 3	0.67 ± 0.04**	0.6 ± 0.14**	0.7 ± 0.51**	0.69 ± 0.52**
Dose 4	/	/	0.58 ± 0.70**	0.5 ± 0.24**

Dose 1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine 3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 4:** 97.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ± ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A 29: Valeurs moyennes des teneurs sériques en protéines totales et en glucose chez les rats témoins et expérimentaux.

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Protéines totales (g/l)</u>				
Témoins	50.14 ± 0.18	50.14 ± 0.18	50.14 ± 0.18	50.14 ± 0.18
Dose 1	50 ± 0.24	50.08 ± 0.24	50.47 ± 0.25	50.86 ± 0.67
Dose 2	45 ± 0.26*	46 ± 0.15*	47.03 ± 0.22*	46.65 ± 0.17*
Dose 3	40.58 ± 0.05**	42.66 ± 0.01**	40.32 ± 0.12**	40 ± 0.32**
Dose 4	/	/	37.65 ± 0.17**	38.24 ± 0.24**
<u>Glucose (mmol/l)</u>				
Témoins	5 ± 0.01	5 ± 0.01	5 ± 0.01	5 ± 0.01
Dose 1	4.8 ± 0.50	4.65 ± 0.35	4.98 ± 0.23	4.72 ± 0.14
Dose 2	4.02 ± 0.04*	3.73 ± 0.11*	4.07 ± 0.15*	4.16 ± 0.46*
Dose 3	3.8 ± 0.14**	3.45 ± 0.06**	3.89 ± 0.31**	4 ± 0.34**
Dose 4	/	/	3.4 ± 0.03**	3.3 ± 0.02**

Dose 1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine 3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 4:** 97.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A 30: Valeurs moyennes des teneurs sériques en créatinine, en urée et en acide urique chez les rats témoins et expérimentaux.

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Créatinine (mmol/l)</u>				
Témoins	7.66 ± 0.12	7.66 ± 0.12	7.66 ± 0.12	7.66 ± 0.12
Dose 1	8.04 ± 0.50	7.93 ± 0.19	8.01 ± 0.15	7.78 ± 0.54
Dose 2	9.17 ± 0.13*	9.32 ± 0.24*	9.47 ± 0.55*	9.45 ± 0.87*
Dose 3	10.02 ± 0.05**	10.58 ± 0.05**	10.66 ± 0.04**	10 ± 0.50**
Dose 4	/	/	10.70 ± 0.37**	11.03 ± 1.10**
<u>Urée (mmol/l)</u>				
Témoins	5.8 ± 0.06	5.8 ± 0.06	5.8 ± 0.06	5.8 ± 0.06
Dose 1	6.1 ± 0.17	6.02 ± 0.11	6.15 ± 0.04	5.96 ± 0.40
Dose 2	8.17 ± 0.08*	7.87 ± 0.40*	7.05 ± 0.28*	7.74 ± 0.26*
Dose 3	9.12 ± 0.23**	9.9 ± 0.36**	9.34 ± 0.51**	9.02 ± 0.34**
Dose 4	/	/	10.12 ± 0.30**	10.04 ± 0.18**
<u>Acide urique (mmol/l)</u>				
Témoins	5.06 ± 0.16	5.06 ± 0.16	5.06 ± 0.16	5.06 ± 0.16
Dose 1	4.9 ± 0.21	4.88 ± 0.13	5 ± 0.27	4.94 ± 0.45
Dose 2	6.54 ± 0.53*	7 ± 0.19*	7.11 ± 0.53*	6.31 ± 0.36*
Dose 3	6.6 ± 0.24**	7.35 ± 0.14**	7.27 ± 0.66**	7.62 ± 0.62**
Dose 4	/	/	8.11 ± 0.72**	8.76 ± 0.24**

Dose 1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine 3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 4:** 97.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A 31: Valeurs moyennes des teneurs urinaires en créatinine, en urée et en acide urique chez les rats témoins et expérimentaux.

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>Créatinine (mg/l)</u>				
Témoins	5 ± 0.42	5 ± 0.42	5 ± 0.42	5 ± 0.42
Dose 1	4.67 ± 0.30	5.08 ± 0.19	4.48 ± 0.15	5.02 ± 0.54
Dose 2	3.5 ± 0.13*	4 ± 0.22*	3.74 ± 0.50*	4.10 ± 0.87*
Dose 3	3.02 ± 0.05**	3.5 ± 0.05**	3.39 ± 0.24**	3.84 ± 0.50**
Dose 4	/	/	3 ± 0.37**	3.12 ± 1.10**
<u>Urée (g/l)</u>				
Témoins	0.62 ± 0.04	0.62 ± 0.04	0.62 ± 0.04	0.62 ± 0.04
Dose 1	0.53 ± 0.07	0.6 ± 0.05	0.58 ± 0.04	0.63 ± 0.01
Dose 2	0.43 ± 0.08*	0.4 ± 0.02*	0.46 ± 0.08*	0.5 ± 0.06*
Dose 3	0.3 ± 0.03**	0.27 ± 0.06**	0.35 ± 0.01**	0.39 ± 0.04**
Dose 4	/	/	0.28 ± 0.03**	0.32 ± 0.18**
<u>Acide urique (g/l)</u>				
Témoins	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.06
Dose 1	0.48 ± 0.01	0.52 ± 0.03	0.54 ± 0.07	0.45 ± 0.05
Dose 2	0.35 ± 0.03*	0.3 ± 0.09*	0.4 ± 0.03*	0.38 ± 0.06*
Dose 3	0.29 ± 0.04**	0.25 ± 0.14**	0.31 ± 0.06**	0.3 ± 0.02**
Dose 4	/	/	0.27 ± 0.02**	0.29 ± 0.04**

Dose 1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine 3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 4:** 97.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A 32: Valeurs moyennes des concentrations de transaminases (TGO et TGP) exprimées en (UI) chez les rats témoins et expérimentaux.

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3	Aziridine 4
<u>TGO (UI)</u>				
Témoins	37 ± 1.89	37 ± 1.89	37 ± 1.89	37 ± 1.89
Dose 1	38 ± 2.10	50.25 ± 6.50	42 ± 3.50	46.9 ± 2.40
Dose 2	92.5 ± 12.50*	89 ± 12.11*	54 ± 8.64*	53 ± 6.50*
Dose 3	126 ± 10.05**	138 ± 10.51**	66 ± 5.35*	94 ± 7.51**
Dose 4	/	/	98 ± 10.50**	101 ± 7.15**
<u>TGP (UI)</u>				
Témoins	62 ± 1.25	62 ± 1.25	62 ± 0.04	62 ± 0.04
Dose 1	69.5 ± 8.54	70.54 ± 7.68	82 ± 5.70	59.7 ± 7.82
Dose 2	84.6 ± 10.50*	86.8 ± 9.25*	84 ± 8.76*	69.5 ± 8.56*
Dose 3	90.56 ± 11.00**	96.15 ± 10.10**	88 ± 11.00**	84.6 ± 10.50**
Dose 4	/	/	100 ± 11.54**	93 ± 11.00**

Dose 1: 6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 2:** 26 mg/kg pour l'aziridine 1, 27.4 mg/kg pour l'aziridine 2, 35 mg/kg pour l'aziridine 3, 37.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 3:** 65 mg/kg pour l'aziridine 1, 68.5 mg/kg pour l'aziridine 2, 87.5 mg/kg pour l'aziridine 3, 93.5 mg/kg pour l'aziridine 4; **Dose 4:** 97.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 102.75 mg/kg pour l'aziridine 2, 131.25 mg/kg pour l'aziridine 3, 140.25 mg/kg pour l'aziridine 4.

Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau A33: Nourriture ingérée exprimé en (g/j/rat) chez les rats témoins et expérimentaux.

Lots de rats	Nourriture ingérée (g/j/rat)	
	BI	BII
Témoins	18 ± 2.00	30 ± 1.88
Aziridine 1	16.66 ± 1.75	28.75 ± 2.14
Aziridine 2	15.53 ± 2.10	26 ± 1.53
Aziridine 3	17.50 ± 1.82	28 ± 1.32
Aziridine 4	18 ± 1.71	30.42 ± 1.07

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

Tableau A33: Nourriture ingérée exprimé en (g/j/rat) chez les rats témoins et expérimentaux.

Lots de rats	Nourriture ingérée (g/j/rat)	
	BI	BII
Témoins	18 ± 2.00	30 ± 1.88
Aziridine 1	16.66 ± 1.75	28.75 ± 2.14
Aziridine 2	15.53 ± 2.10	26 ± 1.53
Aziridine 3	17.50 ± 1.82	28 ± 1.32
Aziridine 4	18 ± 1.71	30.42 ± 1.07

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

Tableau A 34: Apport énergétique exprimé en (KJ/j/P^{0.75}) chez les rats témoins et expérimentaux.

Lots de rats	Apport énergétique (KJ/j/P ^{0.75})	
	BI	BII
Témoins	263.71 ± 14.30	439.53 ± 23.28
Aziridine 1	244.08 ± 20.50	421.21 ± 28.34
Aziridine 2	227.53 ± 22.10	380.92 ± 30.03
Aziridine 3	256.39 ± 17.20	410.22 ± 27.32
Aziridine 4	263.71 ± 31.01	445.68 ± 29.02

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

Tableau A 35: Rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Lots de rats	REN	
	BI	BII
Témoins	0.49 ± 0.04	0.23 ± 0.01
Aziridine 1	0.48 ± 0.05	0.23 ± 0.03
Aziridine 2	0.49 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Aziridine 3	0.43 ± 0.02	0.25 ± 0.02
Aziridine 4	0.49 ± 0.01	0.24 ± 0.02

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

Gain de poids (g)

$$\text{REN} = \frac{\text{Gain de poids (g)}}{\text{Nourriture consommée pour obtenir ce gain de poids (g)}}$$

Tableau A 36: Azote ingéré, urinaire, fécal et excrété (mg/j/ rat) chez les rats témoins et expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Lots de rats	BI	BII
<u>Azote ingéré</u> (mg/j/ rat)		
Témoins	562.5 ± 54.14	937.5 ± 40.57
Aziridine 1	520.62 ± 42.35	898.43 ± 53.03
Aziridine 2	485.31 ± 40.53	812.5 ± 51.98
Aziridine 3	546.87 ± 41.62	875 ± 40.65
Aziridine 4	562.5 ± 32.71	950.62 ± 41.76
<u>Azote urinaire</u> (mg/j/ rat)		
Témoins	78 ± 6.10	126 ± 10.57
Aziridine 1	72 ± 8.15	112 ± 14.03
Aziridine 2	67.32 ± 7.50	106.72 ± 12.98
Aziridine 3	75.77 ± 8.12	98.14 ± 13.25
Aziridine 4	76 ± 6.70	123 ± 15.16
<u>Azote fécal (mg/j/ rat)</u>		
Témoins	40.7 ± 4.10	59.66 ± 5.07
Aziridine 1	38 ± 8.15	57.14 ± 4.84
Aziridine 2	36.91 ± 7.50	48 ± 3.09
Aziridine 3	38.94 ± 6.12	51.38 ± 5.98
Aziridine 4	38 ± 8.70	63.02 ± 3.60
<u>Azote excrété</u> (mg/j/ rat)		
Témoins	118.7 ± 14.00	185.66 ± 13.12
Aziridine 1	110 ± 10.08	169.14 ± 15.98
Aziridine 2	104.23 ± 7.30	154.72 ± 14.76
Aziridine 3	114.71 ± 8.12	149.52 ± 14.09
Aziridine 4	114 ± 10.09	186.02 ± 17.56

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ± ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

Tableau A 37: Coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote (CUD_N), Bilan azoté (BA) chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Lots de rats	BI	BII
CUD_N (%)		
Témoins	92.76± 5.80	93.63 ±3.10
Aziridine 1	92.7 ± 3.12	93.64± 2.87
Aziridine 2	92.39± 4.70	94 ± 2.38
Aziridine 3	92.87± 2.65	94.12± 1.09
Aziridine 4	93.24± 1.91	93.37± 2.56
BA (%)		
Témoins	78.88± 4.90	80.19± 3.78
Aziridine 1	78.87 ± 3.88	81.17 ± 4.08
Aziridine 2	78.52± 3.36	83.41± 3.73
Aziridine 3	79.02± 4.12	82.91± 3.67
Aziridine 4	79.73 ± 2.89	80.43 ± 3.09

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

$$CUD_N (\%) = \frac{N \text{ ingéré} - N \text{ féces}}{N \text{ ingéré}} \times 100$$

$$BA (\%) = \frac{N \text{ ingéré} - (N \text{ urines} + N \text{ féces})}{N \text{ ingéré}} \times 100$$

Tableau 38: Lipides ingérés, lipides fécaux, et coefficient d'utilisation digestive apparente des lipides (CUD_L) chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux au cours des bilans nutritionnels.

Lots de rats	BI	BII
Lipides ingérés (mg/j/rat)		
Témoins	144 ± 5.80	240 ± 13.12
Aziridine 1	133.28 ± 10.08	230 ± 5.98
Aziridine 2	124.24 ± 7.30	208 ± 4.76
Aziridine 3	140 ± 8.12	224 ± 4.09
Aziridine 4	144 ± 10.09	243.36 ± 7.56
Lipides fécaux (mg/j/rat)		
Témoins	85.56 ± 5.70	125.66 ± 4.08
Aziridine 1	79.50 ± 3.28	115.76 ± 4.65
Aziridine 2	74.67 ± 3.06	110.8 ± 2.76
Aziridine 3	82.40 ± 3.72	112 ± 3.86
Aziridine 4	85.56 ± 2.19	118.76 ± 3.54
CUD_L (%)		
Témoins	40.58 ± 1.04	47.64 ± 2.11
Aziridine 1	40.35 ± 1.00	49.66 ± 1.30
Aziridine 2	39.89 ± 1.02	46.73 ± 1.07
Aziridine 3	41.14 ± 1.01	50 ± 1.86
Aziridine 4	40.58 ± 1.01	51.19 ± 2.02

Au cours de l'étude des bilans nutritionnels, les rats expérimentaux reçoivent la dose NOAEL (6.5 mg/kg pour l'aziridine 1, 6.85 mg/kg pour l'aziridine 2, 8.75 mg/kg pour l'aziridine 3, 9.35 mg/kg pour l'aziridine 4). BI : première semaine du mois d'expérimentation ; BII : dernière semaine du mois d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ±ET. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux, au même temps, est réalisée par le test "t" de student, après analyse de la variance. Aucune différence significative n'est notée entre les différents lots de rats.

$$\text{CUD}_L (\%) = \frac{\text{Lipides ingérés} - \text{Lipides fécaux}}{\text{Lipides ingéré}} \times 100$$

ARTICLES



The synthesis of *N*-acyl-2-hydroxymethyl aziridines of biological interest

W. Medjahed, A. Tabet Zatla, J. Kajima Mulengi,* F. Z. Baba Ahmed and H. Merzouk

Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, PO Box 119, 13000 Tlemcen, Algeria

Received 27 August 2003; revised 19 November 2003; accepted 28 November 2003

Abstract—A practical synthesis of the title compounds from protected amino acylazides is described. All the compounds might be considered as a novel class of dipeptide isostere precursors; they all induce lymphocyte proliferation and protein production as observed from preliminary biological tests.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, several papers and reviews have been published regarding a number of aspects of aziridines chemistry.^{1–15} It is well known that natural or synthetic compounds that contain the aziridine moiety generally exhibit interesting biological activity such as antitumour¹⁴ or protease inhibitor properties.¹⁵ Of special interest for us was the assumption that *N*-alkoxy aziridines stimulate the production of leukocytes.¹⁶ On the synthetic background, it is well known that vicinal azido alcohols and triphenylphosphine (Ph₃P) give five-membered intermediates that may afford aziridines spontaneously.¹⁷

We therefore assumed that under the same conditions an iminophosphorane derived from an amino acyl azide would react with an epoxide to yield an aziridine. Glycidol was considered to be the best epoxide since its alkoxide would react with an iminophosphorane to give a nitrogen nucleophile that would open the epoxide, thus leading to hydroxylated compounds that might be considered as analogues or precursors of hydroxy dipeptides isosteres.^{18–20}

2. Results and discussion

In an initial attempt to check our hypothesis, racemates of phthalimido amino acids and glycidol were used as

starting materials. Phthalimido amino acids were prepared according to modified literature procedures²¹ and were recrystallized. They were further converted into azides according to Palomo and co-workers.²² The azides were used without further purification in the next step to yield the target iminophosphoranes according to mechanism displayed in Scheme 1.

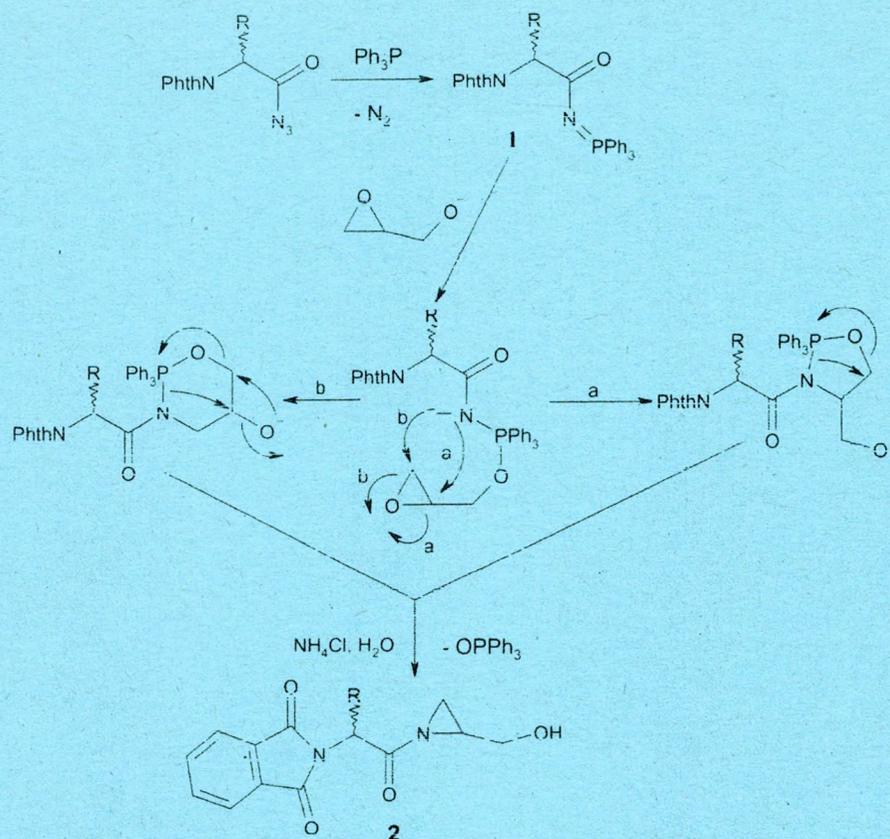
The iminophosphoranes were submitted to a dropwise addition of the glycidol oxyanion generated by treatment of the epoxy alcohol with NaH in dry ether.²³ The oxyanion might initiate attack on the phosphorus atom of **1** generating a nitrogen nucleophile that opens the epoxide ring, thus leading either to a five-membered (a) or a six-membered ring intermediate (b). However, we believe that the five-membered oxazaphospholidine would be more favoured.

After quenching the reaction mixture with an aqueous solution of NH₄Cl and removal of triphenylphosphine oxide, all compounds were purified on a silica gel column using petroleum ether–dichloromethane as the eluent. Satisfactory IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and microanalyses were obtained for all compounds and an example is detailed in the experimental (Table 1).

During NMR analysis, it was observed that signals were not pure multiplets, thus indicating the presence of a mixture of diastereoisomers. Of special interest were the doublet at 1.75 and the quartet at 4.92 ppm. Actually they were superimposed doublets and quartets of almost the same magnitude and could not be separated by NMR analysis.

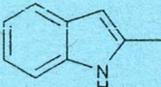
Keywords: Aziridines; Peptide isosteres; Amino acids.

* Corresponding author. Tel./fax: +213-43-21-5886. e-mail: k_mulengi@yahoo.com



Scheme 1. Plausible mechanism for the conversion of the starting azides into aziridines.

Table 1. N-protected hydroxymethylaziridines

2	R	Yield (%)
a	H	51
b	Me	60
c	PhCH ₂	98
d		96
e	(H)PhthN(CH ₂) ₄	60
f	Me ₂ CH	52
g	(H)PhthNC ₆ H ₄ CONH	45
h	Me ₂ CHCH ₂	50

In vitro biological tests were performed on isolated human lymphocytes and each aziridine was used at successive concentrations of 100, 50 and 25 μ M. Glycylaziridine (**2a**) was the most potent in inducing cell proliferation when used at any of the above-mentioned concentrations. Aminohippuryl aziridine (**2g**) was the only one to inhibit cell proliferation when a concentration of 100 μ M was used. However, the same compound induced cell proliferation in the presence of concavalin-A at a concentration of 25 μ M, whereas other aziridines induced lymphocyte proliferation along with protein synthesis to a lower extent than glycyl aziridine.

3. Conclusion

We have developed a straightforward synthesis leading to disubstituted aziridines of biological interest. The synthesis requires simple reagents and the overall procedure provides good to excellent yields of product **2**. In vitro preliminary biological studies performed with racemates have shown promising activity on the proliferation of lymphocytes. However, work with natural amino acids and both (*R*)- and (*S*)-glycidol is under investigation in order to obtain more accurate data on the biological activity dependence on stereochemistry as well as chemical and spectroscopic analytical data of pure stereoisomers.

Acknowledgements

We are indebted to Laboratoire de Pharmacochimie et Systèmes Membranaires, Université Denis Diderot Paris 7/France for ¹H and ¹³C NMR spectra.

References and notes

- Atkinson, R. S. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1519–1559.
- McCoull, W.; Davis, F. A. *Synthesis* **2000**, 1347–1365.

3. Osborn, H. M. I.; Sweeney, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *11*, 1693–1715.
Among recent references see: (a) Boukhris, S.; Souizi, A.; Sun, W.; Xia, C.-G. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3259–3261; (b) Wang, H.-W. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2409–2411.
Choi, S.-K.; Lee, J.-S.; Kim, J.-H.; Lee, W. K. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 743–745.
6. Meguro, M.; Asao, N.; Yamamoto, Y. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7395–7398.
Piro, J.; Forns, P.; Blanchet, J.; Bonin, M.; Micouin, L.; Diez, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 995–1004.
8. Bhanu Prasad, B. A.; Sanghi, R.; Singh, V. K. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7355–7363.
Davis, F. A.; Deng, J.; Zhang, Y.; Haltiwanger, R. C. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7135–7143.
10. Park, C. S.; Choi, H. G.; Lee, H.; Lee, W. K.; Ha, H.-J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 3283–3292.
Vicario, J. L.; Badia, D.; Carrillo, L. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5801–5807.
12. Chandrasekhar, M.; Sekar, G.; Singh, V. K. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10079–10083.
Sekar, G.; Singh, V. K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2537–2539.
14. Papaioannu, N.; Evans, C. A.; Blank, J. T.; Miller, S. J. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2879–2882, and references cited therein.
17. Schirmeier, T.; Peric, M. *Bioorg. Méd. Chem.* **2000**, *8*, 1281–1291.
10. Hanessian, S.; Cantin, L.-D. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 787–790, and references cited therein.
17. Ariza, X.; Pineda, O.; Urpi, F.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4995–4999.
10. Dolle, R. E.; Herpin, T. F.; Shimshock, Y. C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1855–1858.
10. Benedetti, F.; Maman, P.; Norbedo, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10075–10078.
20. Huff, J. R. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2305–2315.
21. (a) Applegate, H. E.; Cimarusti, C. M.; Dolfini, J. E.; Funke, P. T.; Koster, W. H.; Puar, M. S.; Slusarchyk, W. A.; Young, M. G. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 811–818; (b) Duguay, G.; Guémas, J.-P.; Meslin, J.-C.; Pradère, J.-P.; Reliquet, F.; Reliquet, A.; Tea-Gokou, C.; Quiniou, H.; Rabiller, C. *J. Hétérocyclic Chem.* **1980**, *17*, 767–770.
Modified procedure for protection of amino acids: (±)-alanine (0.13 mol) was suspended in glacial acetic acid (40 mL) and phthalic anhydride (0.13 mol) was added. The mixture was refluxed for 2 h until all the solids dissolved and then cooled to room temperature and then in an ice bath. The solid was filtered under suction and recrystallized from water and ethanol (4:1). Other protected amino acids were recrystallized as follows: glycine, leucine (ethanol–water 1:1), phenylalanine, tryptophan (ethanol–water 4:1), 6-amino caproic acid (water–ethanol 2:1), valine (water–ethanol 3:1), amino hippuric acid (ethanol).
22. Arrieta, A.; Aizpurua, J. M.; Palomo, C. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3365–3368. Example of an acyl azide: Phthalimido alanylazide; yield: 78%; mp 79 °C (dec); IR (KBr): 2145, 1730, 1718 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃): 1.68 (d, *J* = 8 Hz, 3H, CH₃), 3.02 (q, *J* = 8 Hz, 1H, CH), 7.83 (s, 4H, PhthN).
23. Synthesis of aziridines. Typical procedure: 2-hydroxy-methyl-1-(*N*-phthaloylalanyl) aziridine **2b**.
Solution A: *N*-acylazide (25 mmol) was introduced under nitrogen to a dry flask containing dry dichloromethane (100 mL). The solution was cooled to 0 °C and triphenylphosphine (25 mmol) was added in small portions and the solution was stirred for 2 h.
Solution B: In a separate flask, sodium hydride (27 mmol) previously washed with ether was introduced in ether (50 mL) and the suspension stirred under nitrogen. To the cooled suspension was added a solution of (±)-glycidol (25 mmol) dropwise in dry ether (50 mL) over 20 min. After the addition was complete, the mixture was stirred for an additional 30 min.
Solution B was then siphoned off under nitrogen into a constant-pressure dropping funnel mounted on the flask containing solution A; this solution was added dropwise to solution A cooled in an ice bath. Following addition, the mixture was warmed to 50 °C for 1.5 h and cooled to room temperature. A solution of 10% ammonium chloride was added and the mixture was extracted with dichloromethane (3 × 25 mL). The organic extracts were combined and dried over anhydrous CaSO₄.
After removal of the solvent, the residue was dissolved in cold anhydrous ether (100 mL) and triphenylphosphine oxide was filtered off under suction. This operation was repeated until no solid separated from the ethereal solution. After removal of the solvent, the residue was purified on a silica gel column using petroleum ether (bp 40–60 °C) and dichloromethane (4:1).
The resulting compound was stored in the cold under dry nitrogen. Yield: 70%; mp 60 °C; IR (KBr): 3457, 1711, 741. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): 1.15 (d, *J* = 7.2, 2H, CH₂), 1.5 (dd, *J* = 6.6, 2 Hz, 1H, CH), 1.75 (d, *J* = 7.4, 3H, CH₃), 3.0 (m, 2H, CH₂-OH), 4.92 (q, *J* = 7.4, 1H, CH), 7.35 (s, 4H, Phth), ¹³C NMR (CDCl₃, 50 Hz): 15.98 (CH₃), 27 (CH₂), 29.56 (CH), 52.09 (CH₂-OH), 52.5 (Phth-CH-CO), 131, 132 (CHar), 137 (Car), 168 (CH-CO-N), 179 (CO-N-CO). Calcd for C₁₄H₁₄N₂O₄: C, 61.34; H, 5.11; N, 10.22. Found: C, 61.40; H, 5.18; N, 10.10.

Effects of N-acyl-2-Hydroxymethyl Aziridines on *in vitro* Proliferative Responses of Human Lymphocytes Stimulated by Mitogens

A. F. BARA¹, W. MEDJAHED², H. MERZOUK¹, J. KAJIMA MULENGI², J. BELLEVILLE³ AND J. PROST³

¹ *Laboratoire de Physiologie Animale et Biochimie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, Algérie*
E-mail: fz_babaahmed@mail.univ-tlemcen.dz

² *Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, Algérie*

³ *UPRES 2422, Lipides et Nutrition, Université de Bourgogne, Dijon, France*

Abstract. Aziridines have been shown to possess marked immunotropic activity. The aim of this work was to study the *in vitro* effects of different concentrations of three novel aziridines, 2-hydroxy-methyl-1-(N-phtaloylglycyl) aziridine (aziridine 1), 2-hydroxy-methyl-1-(N-phtaloylalanyl) aziridine (aziridine 2) and 2-hydroxy-methyl-1-(N-phtaloylphenylalanyl) aziridine (aziridine 3), on the proliferative responses of human lymphocytes stimulated by mitogens (concanavalin A (Con A) and lipopolysaccharide (LPS)), and interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6) secretion. The results showed that aziridines 1 and 3 significantly stimulated the resting and Con A or LPS lymphocyte proliferation at concentrations between 1 μ mol/l and 1 mmol/l, in a dose-dependent manner, the action of aziridine 3 being the highest. They also increased IL-2 and IL-6 secretion. However, aziridine 2 had no effect on the resting lymphocyte proliferation in the absence of mitogens, at any concentration used, reduced Con A-stimulated T lymphocyte proliferation and LPS-stimulated B lymphocyte proliferation in a dose dependent manner and diminished IL-2 and IL-6 production. None of the three aziridines affected cell viability. In conclusion, the three aziridines used in this study displayed immunomodulatory properties. Aziridines 1 and 3 are potentially immunostimulant while aziridine 2 is immunosuppressive and could be used to provide nonspecific cell-mediated immune responses.

Key words: Aziridines — Interleukins — Lymphocyte proliferation — Mitogens

Correspondence to: Josiane Prost, UPRES 2422, Lipides et Nutrition, UFR Sciences de la Vie 6, Boulevard Gabriel, Université de Bourgogne, Dijon 21000, France
E-mail: jprost@u-bourgogne.fr

Introduction

Aziridines have a potential for improving chemotherapeutics. These molecules display potent anticancer and antibiotic activities (Reynolds 1995; Marchini et al. 2001; Papaioannu et al. 2001). They are wellknown covalent DNA-binding drugs which therapeutic effects in tumor models and infections (Remers and Iyengar 1995; Schirmeister 1999). To improve bioavailability for medical applications, a number of aziridines have been synthesized and characterized for over a decade. These compounds have been extensively studied for their structural features and biological functions. They have been shown to possess a marked immunotropic activity. Aziridines modulate both humoral as well as cellular immune systems (Kowalczyk-Bronisz and Zabska 1986; Zabska and Kowalczyk-Bronisz 1987; Hanessian and Cantin 2000). Therefore, in order to improve useful biological properties, efficient new synthetic routes for aziridines would be recommendable. Modulating the immunocompetent cells, especially those involved in lymphocyte activity is of great interest for their role in immune diseases. To explore new aziridines with potential useful biological properties, we synthesized aziridines from protected aminoacyl azides according to a mechanism described previously (Medjahed et al. 2004). In this study, we examined the *in vitro* effects of these aziridines on the proliferative responses of human lymphocytes stimulated by mitogens. Since interleukin-2 (IL-2) and interleukin-6 (IL-6) are cytokines playing a major role in lymphocyte proliferation (Cantrell and Smith 1984; Reickmann et al. 1991), we also determined IL-2 and IL-6 production by stimulated lymphocytes in the presence or absence of these aziridines.

Materials and Methods

Materials

Fasting from 8.00 to 10.00 a.m., venous blood samples from healthy volunteer ($n = 10$) subjects were collected in heparinized tubes. These samples were used for immediate lymphocyte isolation. The purpose of the study was explained to the volunteer subjects and their consent was obtained. The protocol was approved by the ethical committee of the Tlemcen University Hospital.

Three newly synthesized aziridines were obtained from the COSNA (Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses) laboratory of the University of Tlemcen, (Algeria). The synthetic route for the preparation of 2-hydroxy-methyl-1-(N-phtaloylglycyl) aziridine (aziridine 1) and 2-hydroxy-methyl-1-(N-phtaloylalanyl) aziridine (aziridine 2) from amino acids (glycine for aziridine 1 and alanine for aziridine 2) has been previously published (Medjahed et al. 2004). 2-hydroxy-methyl-1-(N-phtaloylphenylalanyl) aziridine (aziridine 3) was synthesized from coupling two phenylalanine and further conversion into aziridine (unpublished data). The chemical structures of aziridines are shown in Figure 1.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was carried out using STATISTICA, version 4.1 (Statsoft, Paris, France). Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the LSD (least significant difference) test. $p < 0.05$ was considered to represent significant statistical differences.

Results

The current study used an *in vitro* model to examine the effects of different concentrations of three aziridines, differing in the nature of radical R (Figure 1), on the proliferative responses of human lymphocytes stimulated by mitogens. The mean mitogen stimulated lymphocyte proliferations from healthy volunteers ($n = 10$), co-cultured with or without aziridines, are shown in Figures 2 to 4.

Effects of aziridines on T and B lymphocytes proliferations

At first, we assessed the effects of aziridines at various concentrations on resting lymphocyte proliferation in the absence of mitogens. Hence, we observed that aziridine 1 (R = H) and aziridine 3 (R = CH₂Ph) significantly stimulated lymphocyte proliferation in a dose-dependent manner (Figures 2 and 4); aziridine 3 action being the highest. However, aziridine 2 (R = CH₃) had no effect on resting lymphocyte proliferation in the absence of mitogens, at any concentration used (Figure 3).

Secondly, we investigated the role of aziridines on mitogen (Con A and LPS)-stimulated T and B lymphocytes. In the presence of either mitogen (Con A or LPS), T lymphocyte (for Con A) and B lymphocyte (for LPS) proliferation was still significantly higher than resting proliferation (without mitogens). Addition of aziridines 1 and 3 potentiated Con A and LPS stimulated lymphocyte proliferation (Figures 2 and 4). In fact, aziridine 1 at concentration between 1 μ mol/l and 1 mmol/l significantly increased Con A-stimulated T lymphocyte proliferation and LPS-stimulated B lymphocyte proliferation (Figure 2) in a dose-dependent manner compared with nonaziridine cultured responses. The same effects were noted when mitogen-stimulated lymphocytes were co-cultured with aziridine 3 at 1 μ mol/l to 1 mmol/l (Figure 4). However, the results on the influence of different concentrations of aziridine 2 on mitogen-stimulated lymphocyte proliferation revealed that aziridine 2 significantly reduced T and B lymphocyte proliferations in a dose dependent manner (Figure 3). The reduction was apparent and occurred at 1 μ mol/l and continued to fall as the aziridine 2 concentrations were increased, reaching a significant maximal inhibition at 1 mmol/l. Cell viability was constantly checked and was unaffected by the concentrations of the aziridines tested.

On the other hand, cell protein contents were also analysed before and after each incubation. The analysis of the results on the influence of aziridines on T- and B-cell protein contents revealed that the variations paralleled those observed for lymphocyte proliferation (data not shown). In summary, the protein contents of lymphocytes without mitogens and without aziridines were 35 ± 3.6 μ g/well;

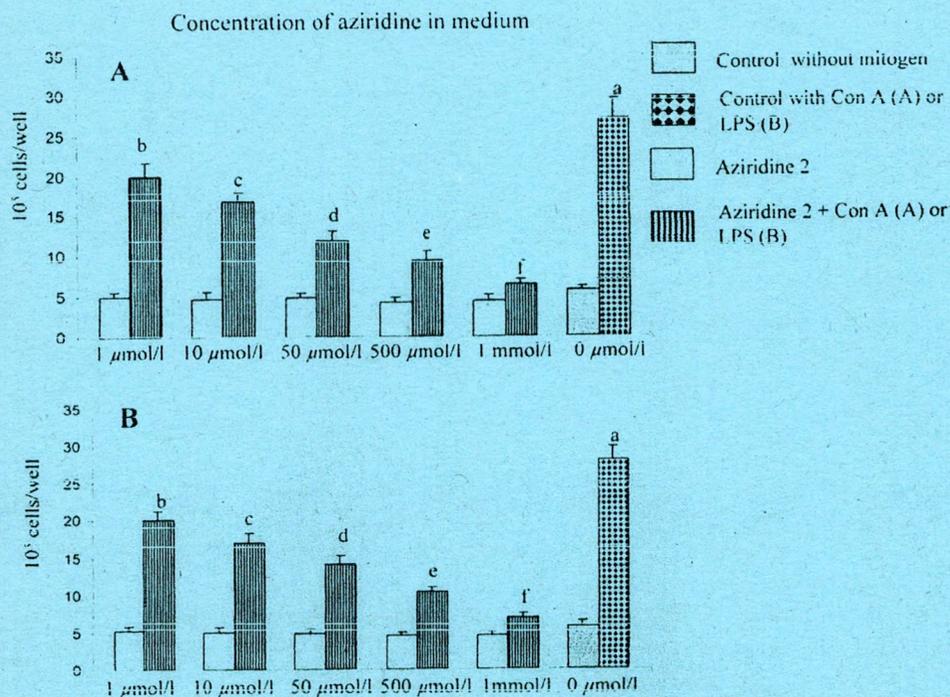


Figure 2. *In vitro* influence of different concentrations of aziridine 1 ($R = H$) on the proliferative response of human lymphocytes stimulated by mitogen Con A (A) or LPS (B). The values are means \pm SEM of triplicate assays from 10 healthy subjects. The values represent the number of cells/well after different incubations. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the LSD test. ^{a,b,c,d,e,f} indicate significant differences obtained with different incubations ($p < 0.05$).

and increased to $280 \pm 28.7 \mu\text{g/well}$ with mitogens. Aziridines 1 and 3 produced an increase while aziridine 2 produced a decrease in lymphocyte protein contents in a dose dependent manner, parallel to their immunomodulatory effects.

Effects of aziridines on IL-2 and IL-6 productions

IL-2 and IL-6 production were markedly increased by aziridine 1 ($R = H$) and aziridine 3 ($R = \text{CH}_2\text{Ph}$), the highest values were observed at concentration 1 mmol/l; the action of aziridine 3 being the highest. However, aziridine 2 ($R = \text{CH}_3$) significantly diminished IL-2 and IL-6 productions (Tables 1 and 2).

Discussion

Aziridines are anti-tumor alkylating agents. Due to the high ring strain of the heterocycle, compounds having an aziridine ring exhibited reactivity towards nu-

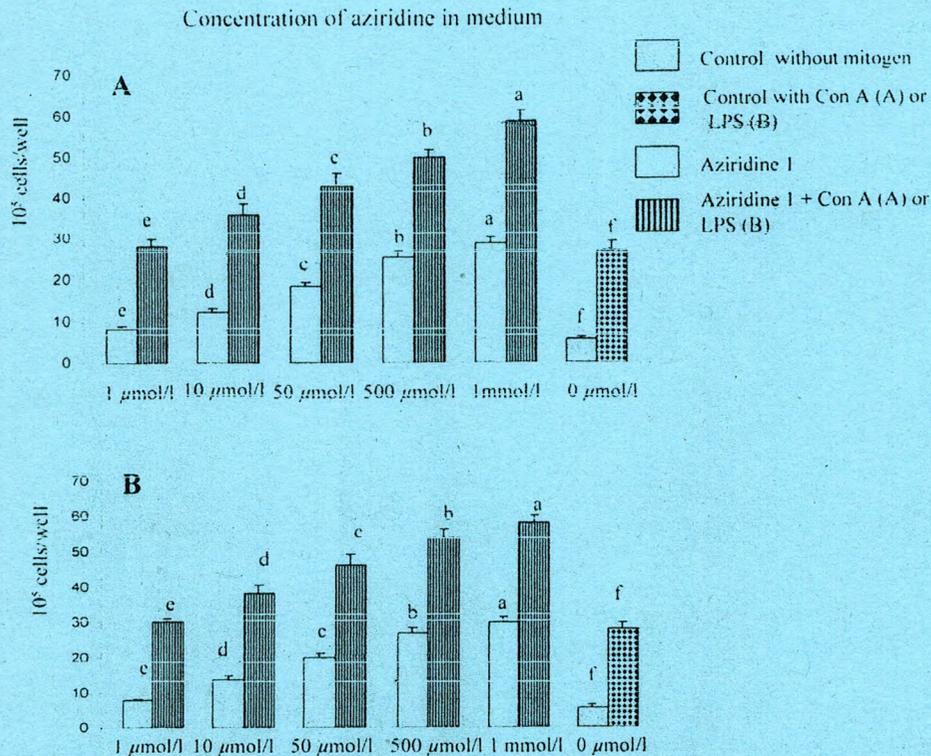


Figure 3. *In vitro* influence of different concentrations of aziridine 2 ($R = CH_3$) on the proliferative response of human lymphocytes stimulated by mitogen Con A (A) or LPS (B). The values are means \pm SEM of triplicate assays from 10 healthy subjects. The values represent the number of cells/well after different incubations. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the LSD test. ^{a,b,c,d,e,f} indicate significant differences obtained with different incubations ($p < 0.05$).

Table 1. Production of interleukin 2 (IL-2 in pg/ml) by concanavalin A (Con A)-stimulated T lymphocytes

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3
Basal	860.55 \pm 46.18 ^e	860.55 \pm 46.18 ^e	860.55 \pm 46.18 ^e
Con A	6724.2 \pm 332.1 ^d	6724.2 \pm 332.1 ^a	6724.2 \pm 332.1 ^d
Con A+50 μ mol/l aziridine	7956 \pm 298 ^c	970 \pm 59 ^d	91786.32 \pm 254.53 ^c
Con A+500 μ mol/l aziridine	8120.24 \pm 279.32 ^b	975 \pm 62 ^c	9346.18 \pm 349.66 ^b
Con A+1 mmol/l aziridine	8566.42 \pm 323.71 ^a	986.32 \pm 49.22 ^b	94876.12 \pm 349.55 ^a

The values are means \pm SEM of triplicate assays from 10 healthy subjects. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the LSD test. ^{a,b,c,d,e} indicate significant differences obtained with different incubations ($p < 0.05$).

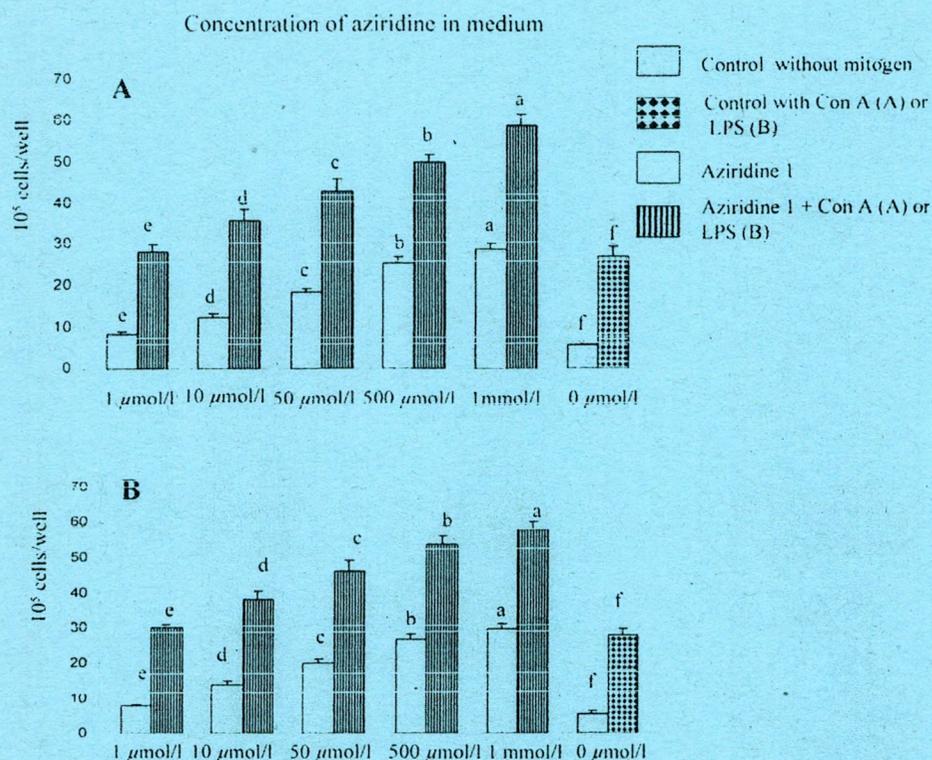


Figure 4. *In vitro* influence of different concentrations of aziridine 3 ($R = CH_2Ph$) on the proliferative response of human lymphocytes stimulated by mitogen Con A (A) or LPS (B). The values are means \pm SEM of triplicate assays from 10 healthy subjects. The values represent the number of cells/well after different incubations. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the LSD test. ^{a,b,c,d,e,f} indicate significant differences obtained with different incubations ($p < 0.05$).

Table 2. Production of interleukin-6 (IL-6 in pg/ml) by LPS-stimulated B lymphocytes

	Aziridine 1	Aziridine 2	Aziridine 3
Basal	144.30 \pm 60 ^e	144.30 \pm 60 ^e	144.30 \pm 60 ^e
LPS	9767.12 \pm 303 ^d	9767.12 \pm 303 ^a	9767.12 \pm 303 ^d
LPS+50 μ mol/l aziridine	9887.62 \pm 414 ^c	211.70 \pm 96.8 ^d	9986.31 \pm 308.46 ^e
LPS+500 μ mol/l aziridine	9979.33 \pm 398 ^b	230.1 \pm 89 ^c	10214.58 \pm 949.16 ^b
LPS+1 mmol/l aziridine	10111.2 \pm 876.22 ^a	297 \pm 68.77 ^b	10457.38 \pm 898.83 ^a

The values are means \pm SEM of triplicate assays from 10 healthy subjects. The values are means \pm SEM of triplicate assays from 10 healthy subjects. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the LSD test. ^{a,b,c,d,e} indicate significant differences obtained with different incubations ($p < 0.05$).

cleophilic and electrophilic reagents. Three novel aziridines synthesized in our laboratory (aziridines 1, 2, 3), were found to alkylate DNA as detected by a single gel electrophoresis (comet assay, alkaline conditions, staining with acridine orange). A clear dose response to the three aziridines was displayed, demonstrable by a marked reduction in DNA electrophoretic mobility (unpublished data). These DNA alkylation damages were in agreement with DNA- drug binding observed with other aziridines (Di Francesco et al. 2000; Vedejs et al. 2003). The present study showed that the three novel aziridines, at the concentrations used in our experiment, have *in vitro* an important modulatory effects on cell mediated and humoral immune responses. To the best of our knowledge, the immunomodulating activity of these novel aziridines has not been documented previously. The immunological properties of other aziridines have been described in the literature (Kowalczyk-Bronisz and Zabska 1986; Zabska and Kowalczyk-Bronisz 1987; Hanessian and Cantin 2000) and could then be used to improve several diseases associated with malfunctioning of the immune system. Immune diseases are diverse and may involve most organs to various degrees. However, the nature of B- or T-cell mediated abnormalities is rarely known. In addition, many cancers can be recognized and destroyed by a tumor specific immune response, usually through CD8+ cytotoxic T-cells and/or natural killer (NK) cells (Melief 1992; Brittenden et al. 1996). Lymphokine-activated killer cells are predominantly IL-2-activated NK cells that are endowed with the ability to eradicate tumor cells (Grimm et al. 1982). Because many tumors fail to stimulate an adequate immune response, researchers are studying methodology to enhance immune responses which may be either cell-mediated or antibody-dependent in cancer therapy. The use of nonspecific cell-mediated modulators could have major advantages in treating immune diseases. The lymphocyte proliferation responses to mitogens, Con A and LPS, were affected by the three aziridines used in our study, the effect being related to the type of radical R (Figure 1). Aziridine 1 and aziridine 3 increased mitogen stimulated lymphocyte proliferation while aziridine 2 decreased it, suggesting that aziridines 1 and 3 are potential immunostimulants whereas aziridine 2 appears as immunosuppressive.

Our results showed that aziridines 1 and 3 enhanced lymphocyte T and B activities measured by proliferative responses to the Con A or LPS mitogen. Lymphocyte proliferation assays are generally used as biomarkers for immune responses to various chemical agents (Purasiri et al. 1997; Bishop et al. 2000; Siwicki and Mizak 2001; Siwicki et al. 2004). In our study, cell proliferation was monitored by counting the cell number and quantifying cell protein contents, and was confirmed by MTT assay. The MTT assay is a sensitive and quantitative method that measures viability, proliferation and activation of cells, and our results are consistent with those obtained from [³H] thymidine uptake assays (Gerlier and Thomasset 1986; Mosmann 1983). The addition of aziridine 1 or aziridine 3 to the culture medium resulted in a dose-dependent stimulation of T or B lymphocyte proliferation. Aziridine 3 was a more potent immunostimulant agent than aziridine 1. Then, the synthesis of aziridines resulting from coupling two amino acids seemed to accentuate their immunological properties. Indeed, aziridines 1 and 3 potentiated the

mitogen stimulated cell proliferation, suggesting that their actions on lymphocytes were mediated by receptors different from the mitogen receptors.

Lymphocyte activation leading to proliferation is a basic phenomenon involved in most immunological events. The first signal is provided by the binding of antigens or mitogens to cell surface receptors. This activation is a complex process which involves a number of plasma membrane-associated events including the activation of phospholipase C with the generation of the second messengers 1,4,5-inositol triphosphate and diacylglycerol, Ca^{2+} mobilization, protein kinase C and tyrosine kinase activation, substrate and ion transport into cell, and secretion of cytokines (Lewis and Cahalan 1989; Weiss et al. 1987; Altman et al. 1990; Cantrell 1996). IL-2 is a potent T lymphocyte growth factor (Cantrell and Smith 1984). IL-6, another cytokine, is shown to potently preserve B-cell viability and plays a significant role in B-cell proliferation and differentiation (Reickmann et al. 1991). IL-2 and IL-6 quantification provided confirmation on lymphocyte proliferation since T- and B-cell growths were associated with the production of IL-2 and IL-6. In our study, aziridine 1 and aziridine 3 increased IL-2 and IL-6 secretion. The mechanisms by which aziridines influence lymphocyte proliferation are not clear and have not been investigated here. However, aziridines 1 and 3 might be expected to influence any step of the processes leading to proliferation, as documented for other immunostimulant agents (Nonnecke et al. 1991; Testerman et al. 1995; Van Kampen 1997; Wagner et al. 1999; Bishop et al. 2000; Siwicki and Mizak 2001; Siwicki et al. 2004). It will be important to further identifying the action mechanisms involved in lymphostimulation by aziridines 1 and 3. It was shown that IL-2 changes were correlated with those for IL-6, CD8+ and NK activity in patients with cancer during anti-tumor therapy (Gao et al. 2005).

On the other hand, aziridine 2 inhibited lymphocyte responses to Con A and LPS in a dose dependent manner, while the viability of cells was unaffected. In our study, aziridine 2 seemed to inhibit lymphocyte proliferation by reducing IL-2 and IL-6 secretion.

In conclusion, the aziridines used in this study displayed immunomodulatory properties depending on the nature of radical R. Aziridines 1 and 3 were immunostimulant while aziridine 2 was immunosuppressive, and could be used to provide non-specific cell mediated immune responses. Immunosuppressive aziridine 2 could be of use as a therapy for acute and chronic inflammation, and for disorders that involve an inappropriately activated immune response. The ability of aziridines 1 and 3 to stimulate lymphocyte proliferation has important implications for their use in treating infections or immunodeficiency syndromes. However, the mechanisms involved in immunomodulation by aziridines remain unknown. Understanding how aziridines mediate their effects can lead to the development of even more effective immunomodulatory agents as well as optimizing their use. The molecular mechanisms of aziridine immunomodulatory properties will be the subject of a forthcoming report.

Acknowledgements. This work was supported by a financial support from the Algerian

Health Investigation Agency (grants ANDRS 02/15/02/00/001 and 05/05/01/01/013). Thanks are due to volunteers for supplying blood samples. We thank A. Magnet, an ESP linguist at the university of Burgundy (France) for editing the manuscript.

References

- Altman A., Coggeshall K. M., Mustelin T. (1990): Molecular events mediating T cell activation. *Adv. Immunol.* **48**, 227—360
- Bishop G. A., Hsing Y., Hostager B. S., Jalukar S. V., Ramirez L. M., Tomai M. A. (2000): Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848. *J. Immunol.* **165**, 5552—5557
- Brittenden J., Heys S. D., Ross J., Eremin O. (1996): Natural killer cells and cancer. *Cancer* **77**, 1226—1243
- Cantrell D. A. (1996): T-cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 259—274
- Cantrell D. A., Smith K. A. (1984): The interleukin 2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* **224**, 1312—1316
- Di Francesco A., M., Hargreaves R. H., Wallace T. W., Mayalarp S. P., Hazrati A., Hartley J. A., Butler J. (2000): The abnormal cytotoxicities of 2,5-diaziridinyl-1,4-benzoquinone-3-phenyl esters. *Anticancer Drug Des.* **15**, 347—359
- Gao Y., Tang W., Dai X., Gao H., Chen G., Ye J., Chan E., Koh H. L., Li X., Zhou S. (2005): Effects of water soluble ganoderma lucidum polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer. *Blood* **106**, 4225—4235
- Gerlier D., Thomasset N. (1986): Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* **94**, 57—63
- Grimm E. A., Mazumder A., Zhang H. Z., Rosenberg S. A. (1982): Lymphokine activated killer cell phenomenon: lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* **155**, 1823—1841
- Hanessian S., Cantin L. D. (2000): The synthesis of enantiomerically pure disubstituted aziridines and N-alkoxy aziridines. *Tetrahedron Lett.* **41**, 787—790
- Kowalczyk-Bronisz S. H., Zabska R. (1986): Studies on the derivatives of aziridine. I. Synthesis and immunopharmacological analysis of amides of α -aziridinyl- β -/p-chlorobenzoyl/-propionic acid. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **34**, 333—350
- Lewis R. S., Cahalan M. D. (1989): Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T-cells. *Cell Regul.* **1**, 99—112
- Marchini S., Damia G., Brogini M., Pennella G., Ripamonti M., Marsiglio A., Geroni C. (2001): 4-demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunoru bicin (PNU-159548), a novel anticancer agent active against tumor cell lines with different resistance mechanisms. *Cancer Res.* **61**, 1991—1995
- Medjahed W., Tabet Zalta A., Kajima Mulengi J., Baba Ahmed F. Z., Merzouk H. (2004): The synthesis of N-acyl-2-hydroxymethyl aziridines of biological interest. *Tetrahedron Lett.* **45**, 1211—1213
- Melief C. J. (1992): Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv. Cancer Res.* **58**, 143—175
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55—63
- Nonnecke B. J., Franklin S. T., Nissen D. J. (1991): Leucine and its catabolites alter mitogen-stimulated DNA synthesis by bovine lymphocytes. *J. Nutr.* **121**, 1665—1672

- Papaioannou N., Evans C. A., Blank J. T., Miller S. J. (2001): Enantioselective synthesis of a mitosane core assisted by diversity-based catalyst discovery. *Org. Lett.* **3**, 2879–2882
- Purasiri P., Mckechni A., Heys S. D., Eremin O. (1997): Modulation *in vitro* of human natural cytotoxicity, lymphocyte proliferative response to mitogens and cytokine production by essential fatty acids. *Immunology* **92**, 166–172
- Rieckmann P., D'Alessandro F., Nordan R. P., Fauci A. S., Kehrl J. H. (1991): IL-6 and tumor necrosis factor- α . Autocrine and paracrine cytokines involved in B cell function. *J. Immunol.* **146**, 3462–3468
- Remers W. A., Iyengar B. C. (1995): Antitumor antibiotics. In: *Cancer Chemotherapeutic Agents* (Ed W. O. Foye), pp. 584–592, American Chemical Society, Washington D.C.
- Reynolds R. C. (1995): Aziridines. In: *Cancer Chemotherapeutic Agents* (Ed W. O. Foye), pp. 186–197, American Chemical Society, Washington D.C.
- Schacterle C. R., Pollack R. L. (1973): Simplified method for the quantitative assay of small amounts of proteins in biological materials. *Anal. Biochem.* **51**, 654–660
- Schirmeister T. J. (1999): New peptidic cysteine protease inhibitors derived from the electrophilic α -amino-acid aziridine-2,3-dicarboxylic acid. *J. Med. Chem.* **42**, 560–572
- Siwicki A. K., Fuller J. C. Jr., Nissen S., Morand M., Pozet F., Vincent F., Kazun B. (2004): Effects of HMB (β -hydroxy- β -methylbutyrate) on *in vitro* proliferative responses of sheatfish (*Silurus glanis*) and catfish (*Ictalurus melas*) lymphocytes stimulated by mitogens. *Acta Vet. (Brno)* **73**, 119–122
- Siwicki A. K., Mizak B. (2001): *In vitro* influence of methisoprinol on lymphocyte proliferation in dogs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **45**, 227–233
- Testerman T. L., Gester J. F., Imbertson L. M., Reiter R. L., Gibson S. J., Wagner T. L., Tomai M. A. (1995): Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J. Leukocyte Biol.* **58**, 365–370
- Van Kampen K. R. (1997): Immunotherapy and cytokines. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small anim.)* **12**, 186–192
- Vedejs E., Naidu B. N., Klapars A., Warner D. L., Li V. S., Na Y., Kohn H. (2003): Synthetic enantiopure aziridinomitosenes: preparation, reactivity, and DNA alkylation studies. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 15796–15806
- Wagner T. L., Ahonen C. L., Couture A. M., Gibson S. J., Miller R. L., Smith R. M., Reiter M. J., Vasilakos J. P., Tomai M. A. (1999): Modulation of Th1 and Th2 cytokine production with the immune response modifiers R-848 and imiquimod. *Cell. Immunol.* **191**, 10–18
- Weiss A., Shield R., Newton M., Manger B., Imboden J. (1987): Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin-2 gene. *J. Immunol.* **137**, 445–447
- Zabska R., Kowalczyk-Bronisz S. H. (1987): Studies on the derivatives of aziridine. II. Synthesis and immunopharmacological analysis of substituted amides and anilides of α -aziridinyll- β -/p-chlorobenzoyl/-propionic acid. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **35**, 681–691

Article original

2-hydroxy-methyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine stimule la prolifération
in vitro des lymphocytes humains et la sécrétion des interleukines

2-hydroxy-methyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine stimulates in vitro
human lymphocyte proliferation and interleukin secretion

F.-Z. Baba Ahmed^a, S. Bouanane^a, S.-A. Merzouk^b, H. Merzouk^{a,*}, W. Medjahed^c,
J. Kajima Mulengi^c, J. Prost^d

^a Laboratoire de physiologie animale et biochimie, département de biologie, faculté des sciences, université Abou-Bekr-Bekaid, BP 119, Imama, 13000 Tlemcen, Algérie

^b Département de physique, faculté des sciences, université Abou-Bekr-Bekaid, BP 119, Imama, 13000 Tlemcen, Algérie

^c Laboratoire de chimie organique, substances naturelles et analyses (COSNA), département de chimie, faculté des sciences, université de Tlemcen, Algérie

^d UPRES 2422, lipides et nutrition, UER sciences de la vie, 6, boulevard Gabriel, université de Bourgogne, 21000 Dijon France

Reçu le 23 février 2007 ; accepté le 9 mai 2007

Disponible sur Internet le 3 juillet 2007

Résumé

But de l'étude. – Il a été démontré que les aziridines possèdent une activité immunotropique marquée. Dans ce travail, les effets in vitro d'une aziridine nouvellement synthétisée (2-hydroxy-méthyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine) sont déterminés sur la prolifération des lymphocytes humains stimulés par les agents mitogènes, et sur la sécrétion des interleukines 2 et 6 (IL-2, IL-6).

Matériel et méthodes. – Les lymphocytes du sang périphérique sont isolés par centrifugation différentielle dans un gradient de Ficoll-Paque. Ils sont mis en culture en présence d'agents mitogènes (concanavaline A, lipopolysaccharide) et de différentes concentrations de l'aziridine testée. La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par le comptage des cellules et par la méthode du MTT [3-(4,5-Diméthyl thiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide]. Après les différentes incubations, le dosage des IL-2 et IL-6 se fait par méthode Elisa.

Résultats. – L'aziridine utilisée stimule considérablement la prolifération des lymphocytes T et B, en absence ou en présence des mitogènes, à des concentrations allant de 1 μ M à 1 mM, d'une manière dose-dépendante. De plus, l'aziridine induit une augmentation significative de la sécrétion des IL-2 et des IL-6.

Conclusion. – La 2-hydroxy-méthyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine est potentiellement immunostimulante et peut être utilisée en immunothérapie à médiation non spécifique, cellulaire ou humorale.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Aim of this work. – Aziridines have been shown to possess marked immunotropic activity. In this study, the in vitro effects of a new aziridine, 2-hydroxy-methyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine, were determined on the proliferative responses of human lymphocytes stimulated by mitogens and on interleukin (IL-2, IL-6) secretion.

Material and methods. – Peripheral blood lymphocytes were isolated using differential centrifugation on a density gradient of Ficoll-Paque. They were cultured with or without mitogens (Concanavalin A and lipopolysaccharide), and with different concentrations of the aziridine. Proliferation was monitored by direct cell counts and confirmed by MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium bromide] assay. After different incubations, IL-2 and IL-6 were determined by using commercially available Elisa kits.

Results. – The aziridine tested significantly stimulated the resting and mitogen T and B lymphocyte proliferation at concentrations between 1 μ M and 1 mM, in a dose-dependent manner. It also increased IL-2 and IL-6 secretion.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : hafidamerzouk_2@hotmail.com (H. Merzouk).

Conclusion. – 2-hydroxy-méthyl-1-(N-phthaloyltryptophyl) aziridine displayed immunomodulatory properties and is potentially immunostimulant. It could be used to provide non-specific cell-mediated immune responses.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Aziridine ; Interleukine ; Lymphocyte prolifération ; Mitogènes

Keywords: Aziridines; Interleukins; Lymphocyte proliferation; Mitogens

1. Introduction

Les progrès et les découvertes réalisés ces derniers temps dans la compréhension de l'oncologie ont contribué à l'amélioration des stratégies thérapeutiques. Les aziridines représentent des agents chimiothérapeutiques d'un grand intérêt dont les activités anticancéreuses et antibiotiques sont largement démontrées [1–3]. Ces molécules sont des agents alkylants, se fixant par liaisons covalentes et entraînant des lésions de l'ADN [4,5]. Afin d'améliorer leur biodisponibilité et leur activité thérapeutique, un grand nombre d'aziridines ont été synthétisées et caractérisées pendant plus d'une décennie. L'importance de ces composés s'étend de leur utilité dans le développement de nouveaux médicaments potentiels à visée anticancéreuse ou antivirale à leurs fonctions biologiques. Il a été démontré que les aziridines possèdent une activité immunotropique marquée. Les aziridines modulent les deux systèmes immunitaires aussi bien humoraux que cellulaires [6–8]. Par conséquent, afin de mettre en valeur leurs propriétés biologiques, les nouvelles voies de synthèse, simples et efficaces sont recommandées. De plus, la modulation des cellules immunocompétentes, particulièrement celles impliquées dans l'activité des lymphocytes est d'un grand intérêt dans le traitement des maladies immunes. De plus, l'immunothérapie constitue une nouvelle voie d'approche pour la thérapie des cancers. Afin d'explorer de nouvelles aziridines à activité biologique, nous avons synthétisé une aziridine à partir d'aminocyl azides protégés selon un mécanisme précédemment décrit [9]. Dans cette étude, nous avons examiné les effets *in vitro* de la 2-hydroxy-méthyl-1-(N-phthaloyltryptophyl) aziridine sur la prolifération des lymphocytes humains stimulés par les mitogènes. Puisque les interleukines 2 (Il-2) et les interleukines 6 (Il-6) sont des cytokines jouant un rôle important dans la prolifération des lymphocytes [10,11], nous avons également déterminé la production des Il-2 et des Il-6 par les lymphocytes stimulés en l'absence ou en présence de cette aziridine.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Les échantillons de sang proviennent de sujets volontaires sains ($n = 10$). Les prélèvements sont réalisés le matin (8:00h–10:00h) à jeun, au niveau de la veine du pli du coude. Le sang est collecté dans des tubes avec un anticoagulant (héparine). Ces échantillons sont utilisés pour l'isolement immédiat des lymphocytes. Le but de l'étude est expliqué aux sujets volontaires et leur consentement écrit est préalablement obtenu. Le protocole est approuvé par le comité d'éthique du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Algérie).

La 2-hydroxy-méthyl-1-(N-phthaloyltryptophyl) aziridine est synthétisée pour la première fois au niveau du laboratoire COSNA (Chimie organique, substances naturelles et analyses) de l'université de Tlemcen. Les réactions chimiques utilisées pour la préparation de cette aziridine à partir du tryptophane ont été publiées et décrites précédemment [9]. La structure chimique de l'aziridine testée est donnée dans la Fig. 1.

2.2. Test de transformation lymphoblastique (TTL)

Les lymphocytes sont isolés du sang veineux hépariné, le jour même du prélèvement, par centrifugation différentielle (400 g pendant 40 minutes) dans un gradient de Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Suisse). Les lymphocytes sont récupérés à l'interface entre le plasma et le Ficoll-Paque puis sont lavés deux fois avec un milieu de culture, RPMI 1640 (Gibco, États-Unis). Après lavage et comptage, une suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 4×10^6 cellules/ml. Afin de déterminer la prolifération cellulaire, 4×10^5 cellules sont mises en culture dans 200 μ l de milieu RPMI 1640 auxquels sont ajoutés le tampon HEPES (25 mM), 10 % sérum du veau fœtal, L-Glutamine (2 mM), 2-mercaptoéthanol (5×10^{-5} M), pénicilline (100 UI/ml) et streptomycine (100 μ g/ml) en présence ou en absence des agents mitogènes. La concanavaleine A (Con A Sigma, Saint-Louis, MO, États-Unis), mitogène spécifique des cellules T est utilisée à une concentration finale de 5 μ g/ml et la lipopolysaccharide (LPS, Sigma, Saint-Louis, MO, États-Unis) mitogène spécifique des cellules B à une concentration finale de 20 μ g/ml. Les cultures sont réalisées en triples, sur des plaques Elisa de 96 puits à fond plat (Nunc, Paris, France) et incubées 48 heures à 37 °C, 5 % de CO₂. Pour déterminer l'effet de l'aziridine, les lymphocytes sont mis en culture en présence de l'aziridine préalablement solubilisée dans l'éthanol, à différentes concentrations finales (0–1 μ M–10–50 μ M–500 μ M–1mM). À la fin de l'incubation, les

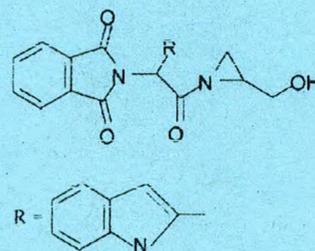


Fig. 1. Structure chimique de l'aziridine testée dans cette étude. Les voies de synthèse de la 2-hydroxy-méthyl-1-(N-phthaloyltryptophyl) aziridine à partir d'acide aminé, tryptophane, sont détaillées dans l'article Medjahed et al. 2004 [9].

cellules sont prélevées dans des tubes secs. Les puits sont lavés avec le milieu RPMI 1640 afin de récupérer l'ensemble des cellules. La viabilité cellulaire est contrôlée en utilisant le bleu de trypan à 0,4 % (colorant permettant de distinguer les cellules vivantes). Elle est non affectée par les concentrations de l'aziridine utilisée dans nos expériences. La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de Malassez), confirmée par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide ; Sigma] décrite par Mosmann [12]. La méthode du MTT est basée sur la capacité des enzymes mitochondriales dans les cellules vivantes de transformer les sels de tétrazolium (couleur jaune) en produits insolubles de formazan (couleur bleue violacée). La concentration de Formazan obtenue est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire. Cette technique permet de mesurer la viabilité et la prolifération lymphocytaire. L'indice de prolifération (IP) est ainsi calculé :

IP = densité optique des cellules stimulées/densité optique des cellules non stimulées.

Les teneurs en protéines cellulaires sont également déterminées après lyse cellulaire avec NaOH (0,1 mol/l). Les concentrations en protéines sont mesurées selon la méthode de Schacterle et de Pollack [13], en utilisant l'albumine bovine comme standard (Sigma chemical company, Saint-Louis, MO).

2.3. Quantifications des interleukines 2 (IL-2) et des interleukines 6 (IL-6)

Une partie aliquote du surnageant de la culture cellulaire est utilisée pour doser les IL-2 et les IL-6 selon le protocole

du kit Eliza (Genzyme, Cambridge, MA, États-Unis). Le principe est basé sur l'utilisation de deux anticorps : un anticorps monoclonal anti-IL et un polyclonal conjugué à la biotine. Une courbe-étalon est préparée à partir du standard IL fourni par le kit de dosage. Les résultats sont exprimés en pg/ml.

2.4. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de **moyenne ± SEM**. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Statsoft, Paris, France). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test Anova. Les différences sont considérées significatives à $p < 0,05$.

3. Résultats

Le modèle de culture cellulaire *in vitro* utilisé dans cette étude permet d'examiner les effets de l'aziridine testée à différentes concentrations sur la prolifération des lymphocytes humains stimulés par des mitogènes. La prolifération des lymphocytes des sujets volontaires en bonne santé ($n = 10$), incubée avec ou sans l'aziridine, est représentée dans les Figs. 2 et 3.

3.1. Effets de l'aziridine sur la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de l'aziridine à différentes concentrations sur la prolifération basale des lymphocytes en absence des mitogènes. Nous avons

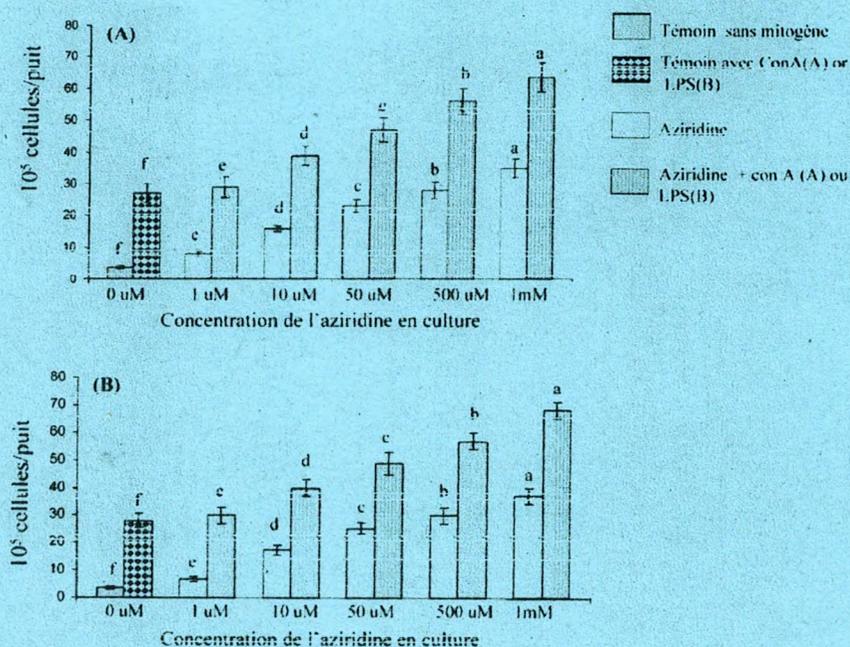


Fig. 2. Effets *in vitro* de différentes concentrations d'aziridine sur la prolifération des lymphocytes stimulée par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM des incubations réalisées en triples chez dix sujets volontaires. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test Anova. ^{a, b, c, d, e, f} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0,05$).

observé que la 2-hydroxy-méthyl-1(N-phthaloyltryptophyl) aziridine stimule significativement la prolifération des lymphocytes d'une façon dose-dépendante, exprimée en nombre de cellules par puit d'incubation (Fig. 2) ou par l'indice de prolifération, IP (Fig. 3).

Deuxièmement, nous avons déterminé les effets de cette aziridine sur la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B stimulés par leurs mitogènes respectifs (Con A et LPS). La présence du mitogène stimule considérablement la prolifération des lymphocytes T (pour la Con A) et des lymphocytes B (pour la LPS). Cela est indiqué par l'augmentation significative du nombre de cellules (Fig. 2) et de l'indice de prolifération en présence des agents mitogènes (Fig. 3). L'addition de l'aziridine potentialise l'effet de la Con A et de la LPS puisqu'une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes est constatée (Figs. 2 et 3). En effet, l'aziridine à une concentration comprise entre 1 μ M et 1 mM augmente d'une manière significative la prolifération des lymphocytes T stimulés par la Con A et la prolifération des lymphocytes B stimulés par la LPS. Cet effet est dose-dépendant.

Par ailleurs, les teneurs en protéines cellulaires ont été également analysées avant et après chaque incubation. L'analyse des résultats montre que l'aziridine entraîne des variations des teneurs en protéines cellulaires (résultats non publiés) parallèles à celles observées concernant la prolifération lymphocytaire. En résumé, les teneurs en protéines des lymphocytes incubés sans les mitogènes et sans l'aziridine sont de $38 \pm 4,9$ μ g/puit ; et augmentent jusqu'à $320 \pm 38,5$ μ g/puit en présence des mitogènes. L'aziridine provoque une augmentation dose-dépendante des teneurs en protéines des lymphocytes.

Tableau 1

Production d'interleukines 2 et 6 (IL-2 ; IL-6) par les lymphocytes activés

	IL-2 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
Basal	848,98 \pm 66,18*****	165,30 \pm 44,89*****
Mitogène	5875,92 \pm 252,67****	7717,12 \pm 315,53****
Mitogène + 50 μ M aziridine	7286,32 \pm 354,83***	8346,31 \pm 308,45***
Mitogène + 500 μ M aziridine	8146,18 \pm 249,66**	11214,58 \pm 749,64**
Mitogène + 1 mM aziridine	9016,12 \pm 259,51*	12857,45 \pm 695,37*

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM des incubations réalisées en triples chez dix sujets volontaires. *, **, ***, ****, ***** indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0,05$). Mitogène : Con A pour les lymphocytes T et le dosage des IL-2 ; LPS pour les lymphocytes B et le dosage des IL-6. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test Anova.

3.2. Effets de l'aziridine sur la production d'interleukines 2 et 6 (IL-2, IL-6)

Les agents mitogènes (ConA et LPS) induisent une augmentation significative de la production des IL-2 par les lymphocytes T et des IL-6 par les lymphocytes B comparée à l'état basal. L'addition de l'aziridine provoque une forte stimulation de la production des IL-2 et des IL-6 ; l'effet est dose-dépendant (Tableau 1).

4. Discussion

Les aziridines sont des agents alkylants antitumoraux. En raison de la présence d'anneau hétérocycle, les aziridines ont montré une grande réactivité vis-à-vis des composés

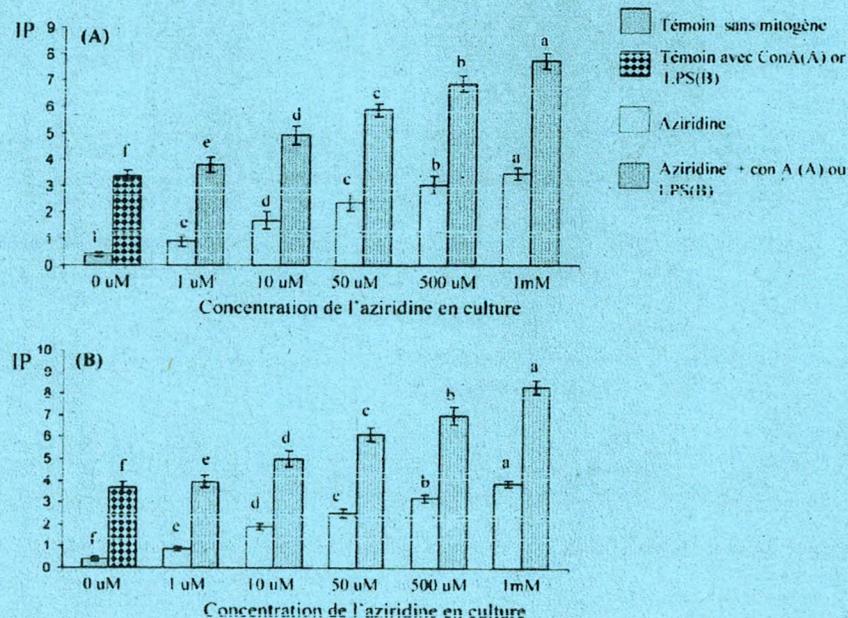


Fig. 3. Effets in vitro de différentes concentrations d'aziridine sur l'indice de prolifération des lymphocytes stimulés par les mitogènes Con A (A) ou LPS (B). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM des incubations réalisées en triples chez dix sujets volontaires. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test Anova. a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0,05$).

nucléophiles et électrophiles. Une nouvelle aziridine est synthétisée dans notre laboratoire à partir d'acides aminés (tryptophane). Son caractère alkylant de l'ADN est détecté par une simple électrophorèse sur gel d'agarose en milieu alcalin et révélation de l'ADN par un marqueur spécifique, l'acridine orange, montrant une réduction marquée de la mobilité électrophorétique de l'ADN (données non publiées). Cet effet d'alkylation de l'ADN est, en accord avec l'interaction ADN-drogue observée avec d'autres aziridines [14,15]. Nos résultats prouvent que la nouvelle aziridine, aux concentrations utilisées, possède in vitro un effet immunomodulateur important sur les cellules à médiation cellulaire et humorale. L'activité immunomodulatrice de la 2-hydroxy-méthyl-1-(N-phtaloyltryptophyl) aziridine n'a pas été documentée précédemment. Cependant, les propriétés immunologiques d'autres aziridines ont été décrites dans la littérature [6-8] et couvrent un vaste champ d'utilisation dans le traitement des maladies liées aux dysfonctionnements du système immunitaire. Nous avons aussi mis en évidence le caractère immunomodulateur de quelques aziridines dont certaines sont immunostimulantes et d'autres immunosuppressives [16]. Les maladies immunes sont diverses et peuvent impliquer la plupart des organes à divers degrés. Cependant, la nature des anomalies affectant les cellules B ou les cellules T est rarement connue. En outre, les tumeurs peuvent être identifiées et détruites par une immunoréaction spécifique, habituellement par les cellules-T cytotoxiques CD8+ et/ou par les cellules tueuses (*naturel killer*, NK) [17,18]. Les cellules tueuses NK, capables de supprimer les cellules tumorales, sont principalement activées par les IL-2 [19]. Cependant, un grand nombre de tumeurs n'induisent pas une immunoréaction adéquate, d'où l'intérêt des recherches actuelles basées sur la stimulation des réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale dans la thérapie du cancer. L'utilisation des substances immunomodulatrices, agissant à la fois sur les lymphocytes B et les lymphocytes T, possède donc des avantages dans les traitements des maladies immunes. Dans notre étude, la 2-hydroxy-méthyl-1-(N-phtaloyltryptophyl) aziridine provoque une augmentation de l'indice de prolifération des lymphocytes B et T, en absence et en présence des agents mitogènes, suggérant que cette aziridine est potentiellement immunostimulante. Les tests de lymphoprolifération sont généralement employés comme biomarqueurs des réponses immunes aux divers agents chimiques [20-23]. Dans notre étude, la prolifération des cellules est déterminée par le comptage des cellules, le dosage des protéines, et par la méthode du MTT. Il s'agit d'une méthode sensible et quantitative. Elle mesure la viabilité, la prolifération et l'activation des cellules, ce qui permet de calculer l'indice de prolifération. Les résultats sont conformes à ceux obtenus suite à l'utilisation de l'incorporation de la [³H] thymidine [12,24]. L'addition de l'aziridine au milieu de culture induit une stimulation dose-dépendante de la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B. De plus, l'aziridine potentialise l'effet des mitogènes sur la prolifération, suggérant que leurs actions sur des lymphocytes sont médiées par des récepteurs différents. L'activation

des lymphocytes est un phénomène de base impliquée dans la plupart des événements immunologiques. Cette activation entraîne une cascade de signaux intracellulaires aboutissant à la prolifération. Le premier signal est déclenché par la liaison des antigènes ou des mitogènes aux récepteurs de surface cellulaire. Par la suite, un processus complexe implique un certain nombre d'événements biochimiques incluant l'activation de la phospholipase C, la génération des seconds messagers 1,4,5-inositol triphosphate et diacylglycérol, l'augmentation du taux Ca²⁺ intracellulaire, l'activation de protéine-kinase C et tyrosine-kinase, le transport des substrats et d'ions dans la cellule, et la sécrétion des cytokines [25-28]. IL-2 est un facteur important de maturation et de croissance des lymphocytes T [10]. IL-6, une autre cytokine, joue un rôle significatif dans la prolifération et la différenciation des cellules B [11]. La quantification des IL-2 et des IL-6 indique que la stimulation de la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B, par leurs mitogènes respectifs, est associée à une production plus importante des IL-2 et des IL-6. Dans notre étude, l'aziridine augmente significativement la sécrétion des IL-2 et IL-6, l'effet étant dose-dépendant. Les mécanismes par lesquels la prolifération des lymphocytes est influencée par l'aziridine ne sont pas encore élucidés. Néanmoins, l'aziridine peut agir sur une étape clé de la cascade de signalisation qui mène à la prolifération et aux fonctions des lymphocytes, comme il a été observé pour d'autres agents immunostimulants [21-23,29-32]. Il a été démontré que les changements des taux d'IL-2 sont corrélés à ceux des IL-6, et aux activités CD8+ et NK chez les patients cancéreux pendant la thérapie antitumorale [33].

5. Conclusion

La 2-hydroxy-méthyl-1-(N-phtaloyltryptophyl) aziridine, utilisée dans cette étude, possède des propriétés immunostimulantes, agissant à la fois sur les lymphocytes B et T. L'emploi de cette aziridine ouvre ainsi une nouvelle voie d'approche pour l'immunothérapie à médiation non spécifique, cellulaire et/ou humorale, au cours du cancer, des infections ou des syndromes d'immunodéficiences.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'Agence nationale pour le développement de la recherche en santé (ANDRS, 02/15/02/00/001 et 05/05/01/01/013). Nos remerciements sont présentés aux volontaires donneurs de sang.

Références

- [1] Reynolds RC. Aziridines. In: Foye WO, editor. *Cancer Chemotherapeutic Agents*. Washington DC: American Chemical Society; 1995. p. 186-97.
- [2] Marchini S, Damia G, Broggin M, Pennella G, Ripamonti M, Marsiglio A, et al. 4-demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin (PNU-159548), a novel anticancer agent active against tumor cell lines with different resistance mechanisms. *Cancer Res* 2001;61:1991-5.

- [3] Papaioannou N, Evans CA, Blank JT, Miller SJ. Enantioselective synthesis of a Mitosane Core Assisted by Diversity-Based Catalyst Discovery. *Org Lett* 2001;3:2879–82.
- [4] Reimers WA, Iyengar BC. Antitumor antibiotics. In: Foye WO, editor. *Cancer Chemotherapeutic Agents*. Washington DC: American Chemical Society; 1995. p. 584–92.
- [5] Schirmeister TJ. New peptidic cysteine protease inhibitors derived from the electrophilic alpha-amine-acid aziridine-2,3-dicarboxylic acid. *J Med Chem* 1999;42:560–72.
- [6] Kowalczyk-Bronisz SH, Zabska R. Studies on the derivatives of aziridine. I. Synthesis and immunopharmacological analysis of amides of alpha-aziridinyl beta-/p- chlorobenzoyl/- propionic acid. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1986;34:333–50.
- [7] Zabska R, Kowalczyk-Bronisz SH. Studies on the derivatives of aziridine. II. Synthesis and immunopharmacological analysis of substituted amides and amilides of alpha-aziridinyl beta-/p- chlorobenzoyl/- propionic acid. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1987;35:681–91.
- [8] Hanessian S, Cantin LD. The synthesis of enantiomerically pure disubstituted aziridines and N-alkoxy aziridines. *Tetrahedron Lett* 2000;41:787–90.
- [9] Medjahed W, Tabet Zalta A, Kajima Mulengi J, Baba Ahmed FZ, Merzouk H. The synthesis of n-acyl-2-hydroxymethyl aziridines of biological interest. *Tetrahedron Lett* 2004;45:1211–3.
- [10] Cantrell DA, Smith KA. The interleukin 2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 1984;224:1312–6.
- [11] Reickmann P, D'Allessandro F, Nordan RP, Fauci AS, Kehri JH. IL-6 and tumor necrosis factor- α autocrine and paracrine cytokines involved in B cell function. *J Immunol* 1991;146:3462–70.
- [12] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [13] Schacterle GR, Pollack RL. Simplified method for the quantitative assay of small amounts of proteins in biological materials. *Anal Biochem* 1973;51:654–60.
- [14] Di Francesco AM, Hargreaves RH, Wallace TW, Mayalarp SP, Hazrati A, Hartley JA, et al. The abnormal cytotoxicities of 2,5-diaziridinyl-1,4-benzoquinone-3-phenyl esters. *Anticancer Drug Des* 2000;15:347–59.
- [15] Vedejs E, Naidu BN, Klapars A, Warner DL, Li VS, Na Y, et al. Synthetic enantiopure aziridinomitosenes: preparation, reactivity, and DNA alkylation studies. *J Am Chem Soc* 2003;125:15796–806.
- [16] Baba Ahmed F, Medjahed W, Merzouk H, Kajima Mulengi J, Belleville J, Prost J. Effects of N-acyl-2-Hydroxymethyl Aziridines on Proliferative Responses of Human Lymphocytes Stimulated by Mitogens. *Gen Physiol Biophys* 2006;25:277–87.
- [17] Melief CJ. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res* 1992;58:143–75.
- [18] Brittenden J, Heys SD, Ross J, Eremin O. Natural Killer cells and cancer. *Cancer* 1996;77:1226–43.
- [19] Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine activated Killer cell phenomenon: lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukine 2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982;155:1823–41.
- [20] Purasiri P, Mckechnie A, Heys SD, Eremin O. Modulation in vitro of human natural cytotoxicity, lymphocyte proliferative response to mitogens and cytokine production by essential fatty acids. *Immunology* 1997;92:166–72.
- [21] Bishop GA, Hsing Y, Hostager BS, Jalukar SV, Ramirez LM, Tomai MA. Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848. *J Immunol* 2000;165:5552–7.
- [22] Siwicki AK, Mizak B. In vitro influence of methisoprinol on lymphocyte proliferation in dogs. *Bull Vet Inst Pulawy* 2001;45:227–33.
- [23] Siwicki AK, Fuller JC, Nissen S, Morand M, Pozet F, Vincent F, et al. Effects of HMB (β -Hydroxy- β -Methylbutyrate) on in vitro proliferative responses of sheatfish (*Silurus glanis*) and catfish (*Ictalurus melas*) lymphocytes stimulated by mitogens. *Acta Vet (Brno)* 2004;73:119–22.
- [24] Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986;94:57–63.
- [25] Lewis RS, Cahalan MD. Mitogen- induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T-cells. *Cell Regul* 1989;1:99–112.
- [26] Weiss A, Shields R, Newton M, Manger B, Imboden J. Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin-2 gene. *J Immunol* 1987;137:445–7.
- [27] Cantrell DA. T-cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996;14:259–74.
- [28] Altman A, Coggeshall KM, Mustelin T. Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol* 1990;48:227–360.
- [29] Nonnecke BJ, Franklin ST, Nissen DJ. Leucine and its catabolites alter mitogen- stimulated DNA synthesis by bovine lymphocytes. *J Nutr* 1991;121:1665–72.
- [30] Testerman TL, Gester JF, Imbertson LM, Reiter RL, Gibson SJ, Wagner TL, et al. Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Leukoc Biol* 1995;58:365–70.
- [31] Van Kampen KR. Immunotherapy and cytokines. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997;12:186–92.
- [32] Wagner TL, Ahonen CL, Couture AM, Gibson SJ, Miller RL, Smith RM, et al. Modulation of Th1 and Th2 cytokine production with the immune response modifiers R-848 and imiquimod. *Cell Immunol* 1999;191:10–8.
- [33] Gao Y, Tang W, Dai X, Gao H, Chen G, Ye J, et al. Effects of water soluble ganoderma lucidum polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer. *Blood* 2005;106:4225–35.

Effets des aziridines de synthèse sur la lymphoprolifération chez les personnes obèses.

BABA AHMED FZ¹, BOUANANE SI, MERZOUK SA², MERZOUK H¹, MEDJAHED W³, KAJIMA MULENGI J³.

1. Laboratoire de Physiologie et Biochimie de la Nutrition. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

2. Département de Physique, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

3. Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Département de chimie. Faculté des Sciences, Université de Tlemcen.

Résumé

Les cellules T sont particulièrement étudiées vu leur importance dans la lutte contre les infections. L'obésité s'accompagne de modifications importantes du système immunitaire. Plusieurs travaux rapportent que la prolifération *in vitro* des cellules T est réduite suite à la diminution de la production de l'interleukine-2 (IL-2) chez les obèses. Il a été démontré que les aziridines possèdent une activité immunotropique marquée. Dans ce travail, les effets *in vitro* d'une aziridine nouvellement synthétisée (2-hydroxy-méthyl-1(N-phthaloyltryptophyl) aziridine) sont déterminés sur la prolifération des lymphocytes stimulés par l'agent mitogène (Con A spécifique des cellules T), et sur la sécrétion des IL-2 chez les obèses. La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par le comptage des cellules et par la méthode du MTT [3-(4,5-Diméthyl thiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide]. Après les différentes incubations, le dosage des IL-2 se fait par méthode ELISA. En Conclusion, l'aziridine utilisée est potentiellement immunostimulante et peut être utilisée en immunothérapie à médiation cellulaire au cours de l'obésité.

Abstract

The T cells are particularly studied considering their importance in the fight against the infections. Obesity is accompanied by significant modifications of the immune system. Several investigations reported that the *in vitro* T cells proliferation and the production of the interleukin-2 (IL-2) are reduced in subjects. It was shown that the aziridines have a marked immunotropic activity. In this work, the *in vitro* effects of a new synthesized aziridine (2-hydroxy-méthyl-1(N-phthaloyltryptophyl) aziridine) are determined on the proliferation of lymphocytes stimulated by mitogenes (Con A specific of the T cells), and on the secretion of IL-2 in obese patients. Lymphocyte proliferation is assayed by counting T cells and by MTT method [3-(4, 5-Diméthyl thiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide]. After various incubations, IL-2 concentrations are determined by ELISA method. In Conclusion, the aziridine used is potentially immunostimulant and can be used in with immunotherapy cellular mediation during obesity.

Mots clés: Obésité - Aziridine - Interleukine - Lymphocyte prolifération - Mitogène.

Key words: Obesity - Aziridine - Interleukins - Lymphocyte Proliferation- Mitogen.

Introduction :

Actuellement, l'obésité représente une véritable épidémie qui s'étend aussi bien aux pays industrialisés qu'aux pays en voie de développement. Sa genèse est un phénomène complexe. En effet, l'obésité est sous l'influence de nombreux facteurs incluant l'hérédité, les facteurs environnementaux et les déséquilibres d'ordre nutritionnel, métabolique, psychologique et social. Plusieurs travaux rapportent des anomalies fonctionnelles des cellules T et une production inefficace de cytokines en faveur de l'apparition d'infections au cours de l'obésité (1). De plus, la prolifération des cellules T *in vitro* est réduite suite à une diminution de la production de l'interleukine-2 (IL-2) chez les obèses. Les aziridines représentent des agents chimiothérapeutiques d'un grand intérêt dont les activités anticancéreuses et antibiotiques sont largement démontrées (2,3). Ces molécules sont des agents alkylants, se fixant par liaisons covalentes et entraînant des lésions de l'ADN (4). Il a été démontré que les aziridines possèdent une activité immunotrope marquée. Les aziridines modulent les deux systèmes immunitaires aussi bien humoraux que cellulaires (5,6). Ces molécules peuvent être utilisées dans la modulation du système immunitaire au cours de l'obésité. Afin d'explorer de nouvelles aziridines à activité biologiques, nous avons synthétisé une aziridine à partir d'aminoacyl azides protégés selon un mécanisme précédemment décrit (7). Dans cette étude, nous avons examiné les effets *in vitro* de la 2-hydroxy-méthyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine sur la prolifération des lymphocytes stimulés par l'agent mitogène (Con A spécifique des cellules T) chez les personnes obèses. Puisque les interleukines – (IL-2) sont des cytokines jouant un rôle important dans la prolifération des lymphocytes (8), nous avons également déterminé la production des IL-2 par les lymphocytes stimulés en l'absence ou en présence de cette aziridine chez les obèses.

Matériel et méthodes :

Matériel

Les échantillons de sang proviennent de personnes obèses (n= 10 ; IMC > 30) du centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen, et de sujets volontaires sains (n=10 ; 18 < IMC < 25). Les prélèvements sont réalisés à jeun, au niveau de la veine du pli du coude. Ces échantillons sont utilisés pour l'isolement immédiat des lymphocytes. Le but de l'étude est expliqué aux sujets volontaires, ainsi qu'aux personnes obèses et leur consentement écrit est préalablement obtenu. Le protocole est approuvé par le comité d'éthique du centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen.

La 2-hydroxy-méthyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine est synthétisée pour la première fois au niveau du laboratoire COSNA (Chimie organique, substances naturelles et analyses) de l'université de Tlemcen. La structure chimique de l'aziridine testée est donnée dans la figure 1.

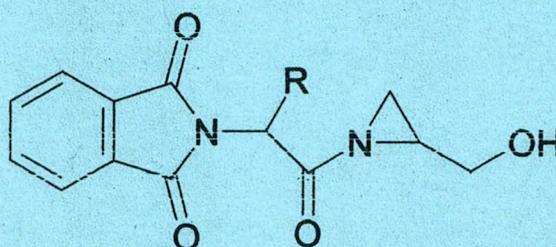
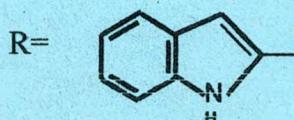


Figure 1 : Structure chimique de l'aziridine testée



Test de transformation lymphoblastique (TTL).

Les lymphocytes sont isolés du sang veineux hépariné, par centrifugation dans un gradient de Ficoll-Paque. Les lymphocytes sont récupérés puis lavés avec un milieu de culture RPMI 1640. Après lavage et comptage, une suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 4×10^6 cellules/ml. Afin de déterminer la prolifération cellulaire, les cellules sont mises en culture dans le milieu RPMI 1640 en présence ou en absence d'agent mitogène, la Concanavaline A (ConA) mitogène spécifique des cellules T. Les cultures sont réalisées en triples, sur des plaques Elisa de 96 puits à fond plat (Nunc) et incubées 48 heures à 37°C, 5% de CO₂. Pour déterminer l'effet de l'aziridine, les lymphocytes T sont mis en culture en présence de l'aziridine, à différentes concentrations finales (0 μ M - 1 μ M - 10 μ M - 50 μ M - 500 μ M - 1 mM). A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans des tubes secs. La viabilité cellulaire est contrôlée en utilisant le bleu de trypan à 0.4 % (colorant permettant de distinguer les cellules vivantes). La détermination de la prolifération se fait par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide ; Sigma] décrite par Mosmann (9). L'indice de la prolifération est calculé par : IP = densité optiques des cellules stimulées / densité optique des cellules non stimulées.

Quantification des interleukines 2 (IL-2)

Une partie aliquote du surnageant de culture cellulaire est utilisée pour doser les IL-2 selon le protocole du kit Elisa (Genzyme, Cambridge, MA, Etats-Unis). Les résultats sont exprimés en pg/ml.

Résultats

La prolifération des lymphocytes T des sujets volontaires en bonne santé (n=10) et des patients obèses (n=10), incubés avec ou sans l'aziridine, est représentée dans les figures 2 et 3.

Chez les témoins

L'aziridine testée stimule significativement la prolifération des lymphocytes T d'une manière dose dépendante, exprimée en nombre de cellules par puit d'incubation (fig.2) ou par l'indice de prolifération, IP (fig.3). La présence du mitogène stimule considérablement la prolifération lymphocytaire. L'addition de l'aziridine potentialise l'effet de la ConA. L'aziridine testée provoque une stimulation de la production de l'IL-2 (tableau 1).

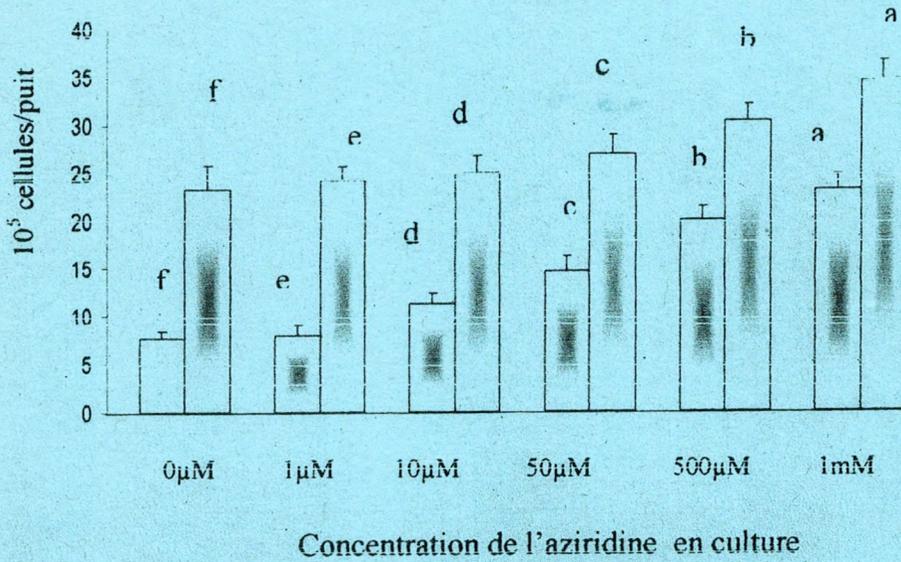
Chez les obèses

La prolifération *in vitro* est réduite suite la diminution du nombre des lymphocytes T chez les obèses comparés aux témoins. L'addition de l'aziridine stimule la prolifération puisque une augmentation significative du nombre des lymphocytes T et de l'IP (fig.3), ainsi qu'une élévation de la sécrétion d'IL-2 (tableau 1) sont constatés. En effet, l'aziridine à une concentration comprise entre 1 μ M et 1 Mm augmente d'une manière significative la prolifération des lymphocytes T chez les obèses. Cet effet est dose dépendant.

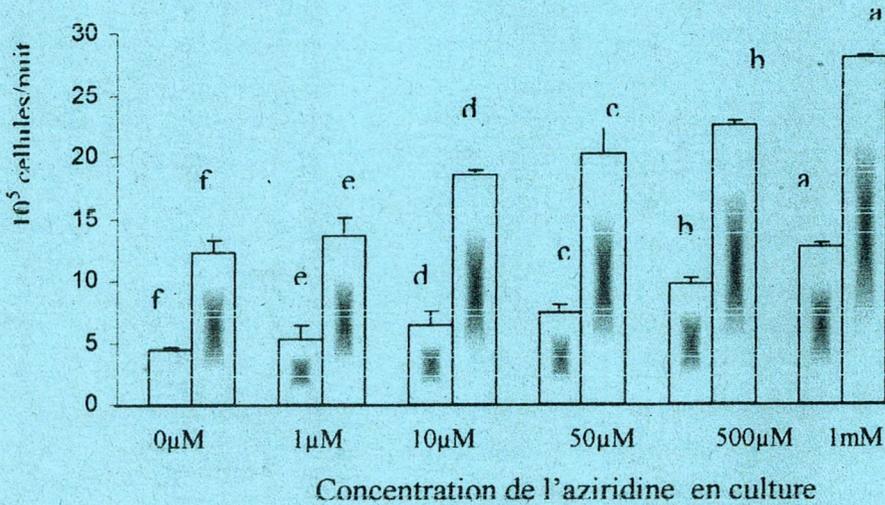
Discussion

Le système immunitaire agit par trois voies essentiellement différentes, à savoir l'immunité humorale, l'immunité à médiation cellulaire et la sécrétion de cytokines. Les cellules T sont particulièrement étudiées vu leur importance dans la lutte contre les infections. L'obésité s'accompagne de modifications importantes du système immunitaire (1). La prolifération *in vitro* est réduite suite à la diminution de la production de l'interleukine-2 (IL-2) chez les obèses. L'utilisation des substances immunomodulatrices, possède donc des avantages dans le traitement des anomalies immunologiques associées à l'obésité. Dans notre étude, la 2-hydroxy-méthyl-1(N-phtaloyltryptophyl) aziridine provoque une augmentation de l'indice de prolifération des lymphocytes T, en absence et en présence de l'agent mitogène, suggérant que cette substance est potentiellement immunostimulante. De plus, l'aziridine potentialise l'effet de la ConA sur la prolifération. IL-2 est un facteur important de maturation et de croissance des lymphocytes T (8). Dans notre étude, l'aziridine augmente significativement la sécrétion des IL-2 aussi bien chez les sujets sains que chez les

A Sujets Témoins



B Patients obèses

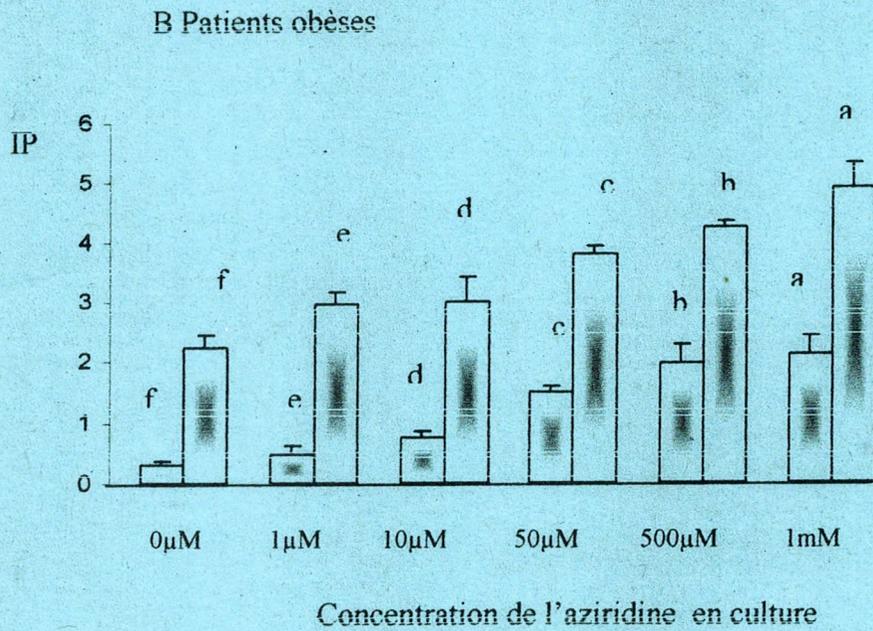
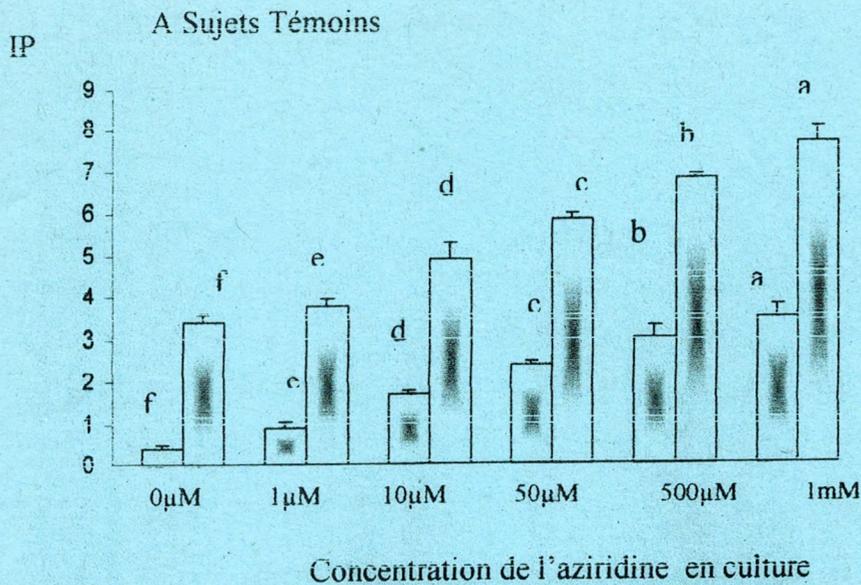


Sans Con A
 ConA
 Aziridine
 Aziridine + Con A

Figure 1. Effets in vitro de différentes concentrations de l'aziridine sur la prolifération des lymphocytes stimulée par le mitogène Con A chez les sujets témoins et les patients obèses.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM des incubations réalisées en triples chez 10 personnes (Témoins ou obèses). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).



Sans Con A
 ConA
 Aziridine
 Aziridine + Con A

Figure 2. Effets in vitro de différentes concentrations d'aziridine sur l'indice de prolifération de lymphocytes stimulée par le mitogène Con A chez les sujets témoins et les patients obèses.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM des incubations réalisées en triples chez 10 personnes (Témoins ou obèses). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

a, b, c, d, e, f indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($P < 0,05$).

Tableau 1 : Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes T activés chez les témoins et chez les obèses.

	IL-2 (pg/ml) Témoins	IL-2 (pg/ml) obèses
Basal	848.98 ± 66.18 ^e	800.59 ± 57.13 ^c
ConA	5875.92 ± 252.67 ^d	5005.88 ± 249.89 ^d
ConA + 50µM aziridine	7286.32 ± 354.83 ^c	6800.52 ± 344.67 ^c
Con A+ 500µM aziridine	8146.18 ± 249.66 ^b	7708.15 ± 249.66 ^b
ConA + 1mM aziridine	9016.12 ± 259.51 ^a	8007.58 ± 259.51 ^a

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ±SEM des incubations réalisées en triples chez 10 personnes Témoins ou obèses. ^a, ^b, ^c, ^d, ^e, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p < 0.05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test Anova.