

## Article original

# Évaluation de la toxicité aiguë de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine chez le rat Wistar

## *Acute toxicity evaluation of 2-hydroxy-methyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine in Wistar rat*

Fatima Zohra Baba Ahmed<sup>1</sup>, Hafida Merzouk<sup>1\*</sup>, Samira Bouanane<sup>1</sup>, Nacira Batoul Benkalfat<sup>1</sup>, Sid Ahmed Merzouk<sup>2</sup>, Joe Kajima Mulengi<sup>3</sup>, Michel Narce<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie Animale et Biochimie. Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Algérie

<sup>2</sup> Département des Sciences Techniques, Faculté des Ingénieurs, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Algérie

<sup>3</sup> Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Département de chimie. Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, Algérie

<sup>4</sup> INSERM UMR 866, "Lipids Nutrition Cancer", Université de Bourgogne, Faculté des Sciences, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

**Résumé – Objectifs :** Les aziridines, molécules alkylantes à l'ADN, possèdent une grande activité anticancéreuse et antibiotique et modulent le système immunitaire. Une nouvelle aziridine, la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine, a été synthétisée dans notre laboratoire. Cependant, sa toxicité n'est pas connue. L'objectif de ce travail est de déterminer la toxicité aiguë de cette aziridine chez le rat Wistar. **Matériel et Méthodes :** Cinq lots de rats Wistar mâles reçoivent une injection intra péritonéale de 9,35 mg/kg, 37,4 mg/kg, 93,5 mg/kg, 140,25 mg/kg, 187 mg/kg d'aziridine, et sont observés pendant 14 jours. Les mortalités, les modifications du comportement, du poids, et les variations de l'ingestion de nourriture et d'eau, du volume des urines et du poids des fèces sont notées. À la fin de l'expérimentation, les rats recevant la dose sans effet toxique observable (NOAEL) sont sacrifiés, les organes et le sang sont prélevés. Les paramètres hématologiques et biochimiques sont dosés. **Résultats :** Les résultats montrent que la DL<sub>50</sub> de l'aziridine testée est de 104,71 mg/kg. L'injection de la dose d'aziridine à 9,35 mg/kg (NOAEL) ne provoque pas de mortalité, ni de variations du poids corporel, de la nourriture et l'eau consommés et des excréta. De plus à cette dose, les taux de globules rouges et blancs et d'hémoglobine ainsi que les paramètres biochimiques (glucose, cholestérol, triglycérides, urée, créatinine, bilirubine, protéines totales, transaminases) et les poids des organes (foie, rein, rate, pancréas, cœur, muscle, et cerceau) ne sont pas affectés. **Conclusion :** La 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine pourrait être éventuellement proposée pour des essais cliniques après avoir procédé à toutes les études toxicologiques pré-requises à ces essais.

**Mots clés :** Aziridine, rat, toxicité aiguë

**Abstract – Objective:** Aziridines, DNA-binding drugs, display potent anticancer and antibiotic activities and modulate the immune system. A new aziridine, 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine, was synthesized in our laboratory; however, its toxicity is not known. The aim of this work is to determine the acute toxicity of this aziridine in Wistar rat. **Material and Methods:** Five groups of male wistar rats were treated with 9.35 mg/kg, 37.4 mg/kg, 93.5 mg/kg, 140.25 mg/kg and 187 mg/kg of the aziridine, and were observed for 14 days. The mortality, comportment and weight modifications, food and water consumption, and urine volume and feces weight were recorded. At day 14, rats treated with the dose without observable toxic effects (NOAEL) were killed, and organs and blood were taken. Hematological and biochemical parameters were investigated. **Results:** Our results showed that the DL<sub>50</sub> of the aziridine tested is 104.71 mg/kg. The administration of this drug at 9.35 mg/kg (NOAEL) had no effects on mortality, body weight, food and water consumed, or excreta. Erythrocyte and leukocyte counts, hemoglobin concentration, and biochemical parameters (glucose, cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, bilirubin, total proteins, transaminases) and organ weight (liver, lung, spleen, gastrocnemius muscle, pancreas, kidney, heart, brain) were not affected.

\* Correspondance : Hafida Merzouk, [hafidamerzouk\\_2@hotmail.com](mailto:hafidamerzouk_2@hotmail.com)

**Conclusion:** 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine could be recommended for clinical use in therapeutic applications after conducting all toxicity studies required for such tests.

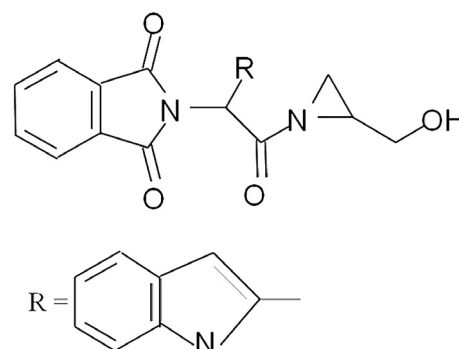
**Key words:** Aziridine, rat, acute toxicity

Reçu le 25 décembre 2009, accepté après modifications le 22 avril 2010

Publication en ligne le 6 juillet 2010

## 1 Introduction

Les aziridines sont des agents alkylants anti-tumoraux et antibiotiques [1–3]. 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 [4,5]. Ces agents interagissent avec l'acide nucléique en empêchant la réplication de l'ADN, en perturbant la division cellulaire et en inhibant la synthèse des protéines. Ils sont donc largement utilisés dans le traitement du cancer. De plus, l'importance des aziridines s'étend de leur utilité comme médicaments potentiels à visée anticancéreuse ou antivirale à leurs fonctions biologiques. Il a été démontré que les aziridines possèdent une activité immunotropique marquée [6, 7]. Les aziridines modulent les deux systèmes immunitaires, aussi bien humoral que cellulaire. Ainsi certaines recherches ont montré que les aziridines sont immunostimulantes ; c'est le cas par exemple de BM 12 531 ou Azimexon [2-cyanaziridinyl-2-carbamoyl-aziridinyl-1-propane], qui provoque une augmentation spontanée de la concentration des lymphocytes T chez les patients cancéreux et module le système immunitaire chez les animaux [8, 9]. D'autres chercheurs ont montré que les aziridines peuvent être aussi des molécules immunodépressives induisant une réduction de la prolifération cellulaire et un déficit immunitaire comme le ciamexon, dérivé de 2-cyan-aziridine, ou le 1,3-(oxytetraéthylénoxy)-cyclotriphosphazène [10, 11]. Vu l'importance des propriétés biologiques des aziridines, de nouvelles voies de synthèse, simples et efficaces, sont de plus en plus recherchées. Afin d'explorer de nouvelles aziridines à activité biologique, nous avons synthétisé des aziridines à partir d'aminoacyl azides protégés selon un mécanisme précédemment décrit [12]. Nous avons mis en évidence le caractère immunomodulateur de ces aziridines dont certaines sont immunostimulantes et d'autres immunosuppressives [13, 14]. Parmi ces aziridines de synthèse, 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, et une stimulation de la sécrétion des cytokines [14]. Le cancer est associé à un dysfonctionnement du système immunitaire et 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'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. Cependant, lors de la découverte de toute substance à pouvoir thérapeutique, les tests de toxicité aiguë constituent une étape préliminaire aux expérimentations précliniques qui re-



**Fig. 1.** Structure chimique de l'aziridine testée dans cette étude. Les voies de synthèse de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine à partir d'acide aminé (tryptophane) sont détaillées dans l'article Medjahed et al. [12].

présentent un préalable indispensable à tout essai chez l'être humain. Ainsi, l'objectif de ce travail est de déterminer la toxicité aiguë de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine chez le rat Wistar, animal de laboratoire choisi pour les essais toxicologiques, afin d'apprécier la dose minimale mortelle (DMM), la dose létale 50 (DL50) et la dose sans effet toxique observable (NOAEL). Les effets *in vivo* de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine à la dose NOAEL sont aussi déterminés en suivant l'évolution de quelques paramètres hématologiques et biochimiques.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Matériel et animaux

La 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine est synthétisée au niveau du laboratoire COSNA (Chimie organique, substances naturelles et analyses) de l'université de Tlemcen (Algérie). Les réactions chimiques utilisées pour la préparation de cette aziridine à partir du tryptophane ont été publiées et décrites précédemment [12]. La structure chimique de l'aziridine testée est donnée dans la figure 1.

L'étude est réalisée sur des rats mâles et femelles adultes, de type « Wistar » âgés de 3 mois. 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*). 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) [15–17]. Les animaux

sont répartis dans des cages métaboliques placées dans l'animalerie maintenue à une température de 25 °C à 30 °C et un taux d'humidité compris entre 60 % et 70 %. Les animaux ont libre accès à l'eau et à la nourriture (régime standard). 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.

## 2.2 Détermination des DMM, DL50 et NOAEL, et observation des manifestations de l'intoxication aiguë

L'étude de la mortalité après une seule administration de l'aziridine permet de déterminer la dose minimale mortelle (DMM) qui tue un animal du lot traité, la dose létale 50 (DL50) qui tue 50 % des animaux traités et la dose sans effet toxique observable (NOAEL) 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 des substances chimiques de HODGE et STERNER, 1949 [16–18].

L'étude est faite sur différents lots de 6 rats. Les rats de chaque lot reçoivent des injections intrapéritonéales de la substance d'épreuve à des doses différentes. Il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée (1 mL/ par 200 g de poids corporel), en faisant varier la concentration de la solution préparée. Les différents lots de rats sont répartis comme suit :

- 1<sup>er</sup> lot témoin : rats recevant une injection intrapéritonéale de 1 mL/ d'eau physiologique par 200 g de poids corporel.
- 2<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> lots expérimentaux : rats recevant une dose de 9,35 mg/kg, 37,4 mg/kg, 93,5 mg/kg, 140,25 mg/kg, 187 mg/kg d'aziridine diluée dans 1 mL d'eau physiologique.

Après administration de la substance, les rats sont observés pendant 14 jours, plusieurs fois par jour. Selon les directives de l'OCDE et du CCPA [15–17], l'observation des animaux est basée sur les cinq paramètres suivants : variation du poids de l'animal (et variations de l'ingestion de nourriture et d'eau, du volume des urines et du poids des fèces) ; apparence physique externe ; signes cliniques mesurables (ex. : changements des rythmes cardiaque et respiratoire et de leur nature) ; changement du comportement ; 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.

À la fin de l'expérimentation (J<sub>14</sub>), les animaux recevant la dose NOAEL (9,35 mg/kg) sont pesés puis anesthésiés au pentobarbital sodique à 6,5 % (0,1 mL par 100 g de poids corporel), après 12 heures 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 gastrocœmien, le cœur et le cerveau) sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 9 %, ensuite pesés.

## 2.3 Méthodes

### 2.3.1 Paramètres hématologiques

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 × 40. L'hémoglobine est dosée par la méthode colorimétrique de DRABKIN (cyanométhémoglobine).

### 2.3.2 Paramètres biochimiques

La fonction rénale est appréciée par le dosage de la créatinine et de l'urée sériques (Kits Sigma Chemical Company, St Louis, MO, US).

La fonction hépatique est appréciée par l'activité enzymatique des transaminases glutamo-oxaloacétique (TGO) et glutamo-pyruvique (TGP) et le dosage de la bilirubine et des protéines totales sériques (Kits Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA).

Le glucose, le cholestérol total et les triglycérides sériques sont dosés par des méthodes enzymatiques (Kits Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA).

## 2.4 Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± 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  $p < 0,05$ .

## 3 Résultats

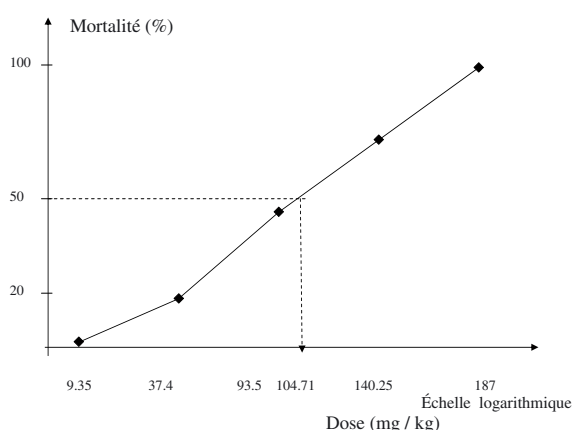
### 3.1 Evaluation de la toxicité aiguë

Après injection intrapéritonéale de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) 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 l'aziridine testée. Nos résultats montrent que la DMM de l'aziridine testée est de 37,40 mg/kg alors que la DL<sub>50</sub> 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 I, figure 2). La DL<sub>50</sub> de l'aziridine est donc estimée à 104,71 mg/kg. Aucun rat du lot recevant l'aziridine à une dose de 9,35 mg/kg n'est mort, ce

**Tableau I.** Taux de mortalité des rats après injections de différentes doses de la 2- hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine.

Rats	Doses (mg/kg)	Taux de mortalité	Pourcentage de mortalité (%)
Lot 1 (n = 6)	9,35	0	0
Lot 2 (n = 6)	37,4	1	16,67
Lot 3 (n = 6)	93,5	2	33,33
Lot 4 (n = 6)	140,25	4	66,67
Lot 5 (n = 6)	187	6	100

Après injection intrapéritonéale de l'aziridine à différentes doses, les rats sont observés pendant 14 jours. Le taux de mortalité est noté pour chaque dose utilisée.



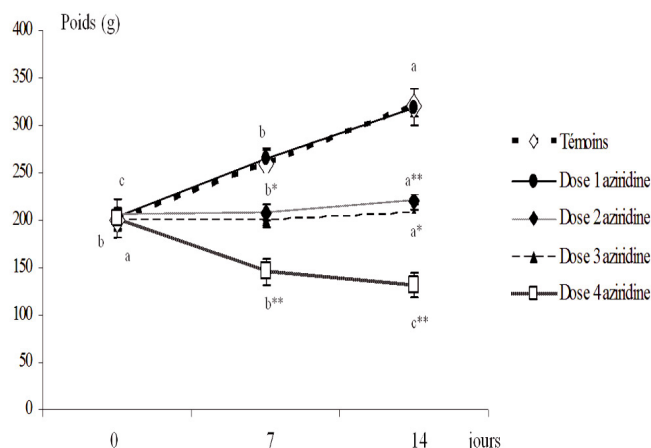
**Fig. 2.** Courbe dose-létalité après injection intrapéritonéale de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine.

qui nous porte à suggérer que cette dose est la dose sans effet toxique observable (NOAEL).

L'administration de l'aziridine a provoqué chez les rats différents signes cliniques dont la sévérité et l'intensité augmentent avec la dose injectée. Les signes les plus caractéristiques sont une baisse de l'activité motrice, des troubles respiratoires de type polypnée, des torsions avec redressement des poils, agitation suivie d'une somnolence. Les symptômes de toxicité sont apparus 24 heures après l'injection de l'aziridine, sauf pour les rats traités avec la dose de 9,35 mg/kg qui ne présentent aucun signe clinique anormal. Nos résultats montrent que l'injection d'aziridine à la dose de 37,4 mg/kg constitue le point à partir duquel les états physiologiques et mentaux de l'animal sont déviants de la normale. À 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. À la dose de 187 mg/kg, tous les animaux sont moribonds, ce qui constitue le point limite dans les tests toxicologiques.

### 3.2 Variation du poids corporel, des ingestions et des excréments

Au cours de la période d'expérimentation (14 jours), le poids des rats est noté quotidiennement le matin à la même



**Fig. 3.** Évolution du poids corporel des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'observation. Chaque valeur représente la moyenne ± ET. J<sub>0</sub> : poids initial; J<sub>7</sub> : poids après une semaine; J<sub>14</sub> : poids après 2 semaines. Dose 1 : 9,35 mg/kg; dose 2 : 37,50 mg/kg; dose 3 : 93,50 mg/kg; dose 4 : 140,25 mg/kg. 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, les multiples comparaisons (en fonction du temps) sont réalisées par le test ANOVA. Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

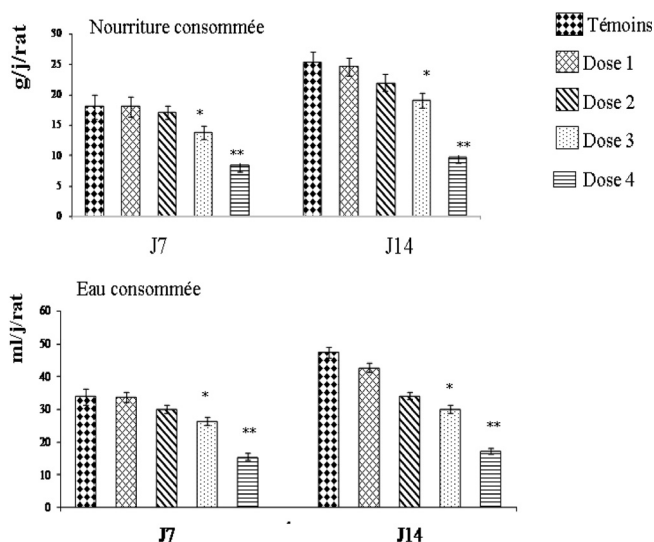
heure. Les variations du poids corporel sont déterminées chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux. Seules les valeurs à J<sub>0</sub> (au moment des injections), J<sub>7</sub> (fin de la première semaine) et J<sub>14</sub> (fin de la période d'observation) sont reportés dans la figure 3.

Au début de l'expérimentation (J<sub>0</sub>), les différents lots de rats ont des poids homogènes, variant de 196 à 210 g. L'injection de la première dose (9,35 mg/kg) de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine ne provoque pas de variations significatives du poids corporel des rats expérimentaux comparés aux témoins aux différents temps (J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub>). En revanche, l'injection des autres doses supérieures à cette dose est associée à une diminution du poids corporel des rats expérimentaux comparés à leurs témoins à J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub>. Cette réduction est plus importante à J<sub>14</sub>.

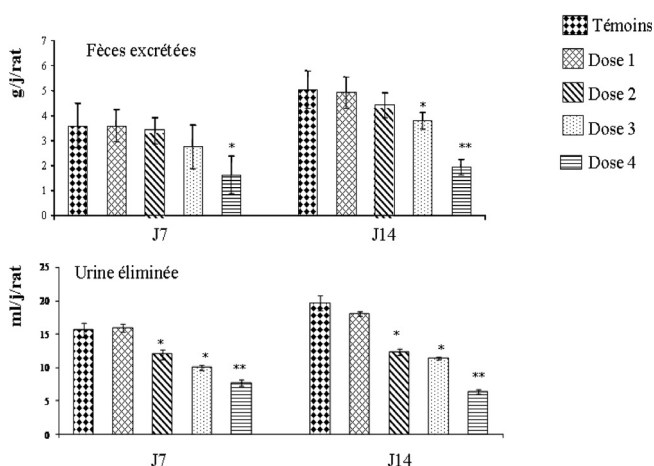
L'injection de la dose 9,35 mg/kg ne provoque pas de variations significatives de l'ingestion d'aliments et d'eau des rats expérimentaux comparés aux témoins durant la première semaine et la deuxième semaine d'observation. En revanche, la consommation alimentaire exprimée en g/j/rat et l'ingestion d'eau exprimée en mL/j/rat sont fortement diminuées suite à l'injection des doses plus importantes (figure 4).

L'injection de la dose 9,35 mg/kg ne provoque pas de variations significatives de l'excrétion fécale exprimée en (g/j/rat) et urinaire exprimée en (mL/j/rat) des rats expérimentaux comparés aux témoins durant les 14 jours d'expérimentation. Aux doses d'aziridine plus élevées, les excréments fécale et urinaire sont fortement diminués chez les rats traités comparés aux rats témoins (figure 5).





**Fig. 4.** Consommation alimentaire (g/j/rat) et ingestion d'eau (mL/j/rat) des rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ± ET. Dose 1 : 9,35 mg/kg ; dose 2 : 37,5 mg/kg ; dose 3 : 93,5 mg/kg ; dose 4 : 140,25 mg/kg. 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. \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$ .



**Fig. 5.** Quantité de fèces excrétées (g/j/rat) et volume d'urine éliminée (mL/j/rat) par les rats témoins et expérimentaux (injection d'aziridine) durant les 14 jours d'expérimentation. Chaque valeur représente la moyenne ± ET. Dose 1 : 9,35 mg/kg ; dose 2 : 37,50 mg/kg ; dose 3 : 93,50 mg/kg ; dose 4 : 140,25 mg/kg. 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. \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$ .

### 3.3 Variation des paramètres hématologiques et biochimiques

Les résultats ci-dessus suggèrent que la dose NOAEL de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine est de 9,35 mg/kg. Afin de s'assurer de la non toxicité de cette dose, quelques paramètres hématologiques et biochimiques

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

Paramètres	Témoins	Expérimentaux (9,35 mg aziridine/kg)
Globules rouges ( $10^6/mm^3$ )	6,26 ± 0,16	6,13 ± 0,29
Globules blancs ( $10^3/mm^3$ )	3,95 ± 0,23	4,05 ± 0,37
Hémoglobine (mg/dL)	12,03 ± 0,71	11,87 ± 0,65

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

NB : Les variations entre rats témoins et expérimentaux sont non significatives.

**Tableau III.** Paramètres biochimiques sériques chez les rats témoins et chez les expérimentaux (9,35 mg aziridine/kg).

Paramètres	Témoins	Expérimentaux (9,35 mg aziridine/kg)
Protéines totales (g/L)	56,14 ± 1,18	58,86 ± 1,67
Glucose (mmol/L)	5 ± 0,31	4,72 ± 0,44
Créatinine (mmol/L)	7,66 ± 0,42	7,78 ± 0,54
Urée (mmol/L)	5,80 ± 0,36	5,96 ± 0,40
Bilirubine totale ( $\mu$ mol/L)	15,70 ± 1,49	14,99 ± 1,96
Cholestérol total (mmol/L)	2,10 ± 0,20	2,28 ± 0,37
Triglycérides (mmol/L)	0,90 ± 0,16	1,12 ± 0,24
TGO (UI)	27 ± 3,89	32,90 ± 2,40
TGP (UI)	32 ± 4,25	39,70 ± 7,82

Chaque valeur représente la moyenne ± ET. TGO : glutamo-oxaloacétique transaminase ; TGP : glutamo-pyruvique transaminase. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et expérimentaux est réalisée par le test « t » de student, après analyse de la variance.

NB : Les variations entre rats témoins et expérimentaux sont non significatives.

sont analysés chez les rats traités à cette dose à la fin de l'expérimentation (J<sub>14</sub>).

L'injection de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine à 9,35 mg/kg ne provoque pas de variations significatives des globules blancs, des globules rouges et du taux d'hémoglobine des rats expérimentaux comparés aux témoins (tableau II).

L'injection de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine à 9,35 mg/kg ne provoque pas de variations significatives des teneurs sériques en glucose, cholestérol total, triglycérides, protéines totales, urée, créatinine et bilirubine ainsi que des activités des enzymes TGO et TGP chez les rats traités comparés aux rats témoins (tableau III).

### 3.4 Poids des différents organes

Le poids relatif des organes (poids de l'organe/ poids du rat × 100) indique l'évolution pondérale de l'organe par rapport à l'organisme.

Suite à l'injection de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine à 9,35 mg/kg, les poids relatifs des différents organes (foie, rein, rate, pancréas, cœur, muscle, et

**Tableau IV.** Poids moyen des organes (g) des rats témoins et des rats expérimentaux (9,35 mg aziridine/kg).

Organes	Témoins	Expérimentaux (9,35 mg aziridine/kg)
Foie	8,71 ± 1,42	8,65 ± 1,10
Rein	1,74 ± 0,42	1,68 ± 0,21
Rate	1,54 ± 0,36	1,50 ± 0,28
Pancréas	0,90 ± 0,16	0,89 ± 0,12
Cœur	1,60 ± 0,11	1,57 ± 0,21
Muscle	0,61 ± 0,06	0,60 ± 0,05
Cerveau	1,32 ± 0,12	1,29 ± 0,11

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

NB : Les variations entre rats témoins et expérimentaux sont non significatives.

cerveau) chez les rats expérimentaux restent stables par rapport à leurs témoins (tableau IV).

#### 4 Discussion

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, de nouvelles aziridines ont été 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 [12]. Nous avons démontré leurs effets immunomodulateurs, la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine étant la plus immunostimulante [13,14]. Cependant, la toxicité et les effets *in vivo* de cette nouvelle aziridine n'ont pas été documentés précédemment. Notre travail est donc consacré à l'étude *in vivo* visant à déterminer les effets de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine chez le rat Wistar, et par la suite permettre ou non de la 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 sur des animaux de laboratoire. Dans notre étude, l'injection intrapéritonéale de l'aziridine à différentes doses chez les rats et leur observation pendant 14 jours, a montré des effets différents selon la dose injectée. La DL50 est de 104,71 mg/kg pour l'aziridine testée. Selon l'échelle de toxicité internationale, cette aziridine se classe comme substance moyennement toxique [16–18]. La DMM est de 37,40 mg/kg puisqu'elle entraîne la mort de un rat du lot traité. Les symptômes de toxicité apparaissent à cette dose et sont caractérisés par des signes externes dont la sévérité augmente avec la dose injectée. De plus, une diminution du poids corporel, de la nourriture et d'eau consommés, du volume d'urine et de la quantité de fèces éliminées sont notées chez les rats traités par les doses d'aziridine allant de 37,4 mg/kg à 187 mg/kg, ceci étant associé à une augmentation de la mortalité des rats.

Dans notre étude, l'injection de la dose 9,35 mg/kg ne provoque pas de mortalité ni de signe clinique particulier chez

les rats. L'injection de la dose 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, qui est similaire à celui des témoins. Nos résultats montrent aussi que l'injection de la dose 9,35 mg/kg d'aziridine ne provoque pas de variations significatives de la nourriture et d'eau consommées, ou de l'excrétion fécale et urinaire des rats expérimentaux en comparaison avec leurs témoins. Il apparaît clairement que la dose sans effet toxique observable (NOAEL) de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine par voie intrapéritonéale est de 9,35 mg/kg. Afin de s'assurer de la non toxicité réelle de cette dose d'aziridine, différents paramètres hématologiques et biochimiques sont dosés chez les rats traités à la fin de l'expérimentation (J<sub>14</sub>) et sont comparés à ceux des rats témoins. Nos résultats montrent que l'injection de la dose NOAEL ne provoque pas de variations significatives des taux en globules blancs, en globules rouges et en hémoglobine des rats expérimentaux comparés aux témoins. Les nombreux mécanismes physiologiques reflétés par ces paramètres hématologiques (respiration, immunologie, ...) restent donc normaux chez ces rats traités.

La créatinine et l'urée constituent d'excellents marqueurs de la fonction rénale, leur augmentation ou leur diminution reflète un dysfonctionnement rénal [19]. Ces taux ne varient pas chez les rats recevant la dose NOAEL d'aziridine, marquant une fonction rénale normale.

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 [20]. Les valeurs moyennes des transaminases glutamo-oxaloacétique (TGO) et glutamo-pyruvique (TGP) sont restées dans les limites normales chez les rats expérimentaux comparées à leurs témoins, suite à l'injection de la dose NOAEL d'aziridine. La fonction hépatique est aussi appréciée par le dosage de la bilirubine, dont les taux sériques sont restés normaux chez les rats traités. De plus, l'injection de la dose NOAEL d'aziridine n'entraîne aucune variation significative des teneurs sériques en cholestérol total (CT), en triglycérides (TG), en protéines totales et en glucose chez les rats expérimentaux par rapport à leurs témoins, reflétant des métabolismes glucidique, lipidique et protéique normaux.

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'aziridine testée à la dose de 9,35 mg/kg ne modifie pas le poids des différents organes (foie, rein, rate, pancréas, cœur, muscle, et cerveau).

Ainsi, la dose 9,35 mg/kg de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine ne provoque aucune altération clinique ni métabolique chez le rat Wistar. 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) [21]. La dose recommandée sera au maximum égale à 0,93 mg/kg. Considérant le volume sanguin moyen de l'homme qui est de 60 mL/kg, la dose circulant dans l'organisme sera en moyenne de 0,016 mg/mL ou 16 µg/mL. Cette dose est particulièrement

intéressante puisque des concentrations égales ou inférieures stimulent les lymphocytes humains *in vitro* [14].

## 5 Conclusion

De ces résultats, il apparaît clairement que l'emploi de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine nouvellement synthétisée au niveau du laboratoire COSNA pourrait être recommandée à des doses inférieures à 1mg/kg pour des essais cliniques 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. Cependant, d'autres tests comme l'histologie des organes et les essais de toxicité chronique, entre autres, sont nécessaires afin de s'assurer de la non toxicité de cette aziridine.

*Remerciements.* Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'Agence nationale pour le développement de la recherche en santé (ANDRS).

**Conflit d'intérêt.** Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

## Références

- Huang D, Okada K, Komori C, Itoi E, Suzuki T. Enhanced anti-tumor activity of ultrasonic irradiation in the presence of new quinolone antibiotics *in vitro*. *Cancer Sci.* 2004; 95: 845–849.
- Vainchtein LD, Rosing H, Mirejovsky D, Lenaz L, Schellens JH, Beijnen JH. Stability experiments in human urine with EO9 (apaziquone): a novel anticancer agent for the intravesical treatment of bladder cancer. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43: 285–292.
- Bracci L, Moschella F, Sestili P, La Sorsa V, Valentini M, Canini I, Baccarini S, Maccari S, Ramoni C, Belardelli F, Proietti E. 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.* 2007; 13: 644–653.
- Kiss L, Mangelinckx S, Fülöp F, De Kimpe N. Convenient synthesis of trans-beta-amino carboxylic esters with an azetidine skeleton via rearrangement of beta, gamma-aziridino alpha-amino esters. *Org Lett.* 2007; 9: 4399–402.
- Warner DL, Hibberd AM, Kalman M, Klapars A, Vedejs E. N-Silyl Protecting Groups for Labile Aziridines: Application toward the Synthesis of N-H Aziridinomitosenes. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56: 311–314.
- 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.* 1986; 34: 333–350.
- Hanessian S, Cantin LD. The synthesis of enantiomerically pure disubstituted aziridines and N-alkoxy aziridines. *Tetrahedron Lett.* 2000; 41: 787–790.
- Srikrishnan T. 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.* 1990; 5: 213–220.
- Becker U. Immunomodulating effects of BM 12.531 in animals and tolerance in man. *Cancer Treat Rev.* 1978; 11: 1987–1996.
- Baier J, Neumann HA, Ricken O. No inhibition of interferon gamma release in human lymphocytes by Ciamexone. *Cancer immunol immunother.* 1991; 40: 1987–1996.
- Siwy M, Sek D, Kaczmarczyk B, Wietrzyk J, Nasulewicz A, Opolski A. Synthesis and *in vitro* antiproliferative activity of new 1,3-(oxytetraethylenoxy)-cyclotriphosphazene derivatives. *Anticancer Res.* 2007; 27: 1553–1558.
- Medjahed W, Tabet Zalta A, Kajima Mulengi J, Baba Ahmed FZ, Merzouk H. The synthesis of n-acyl-2-hydroxyméthyl aziridines of biological interest. *Tetrahedron Lett.* 2004; 45: 1211–1213.
- Baba Ahmed F, Medjahed W, Merzouk H, Kajima Mulengi J, Belleville J, Prost J. Effects of N-acyl-2-Hydroxyméthyl Aziridines on Proliferative Responses of Human Lymphocytes Stimulated by Mitogens. *Gen Physiol Biophys.* 2006; 35: 277–287.
- Baba Ahmed FZ, Bouanane S, Merzouk SA, Merzouk H, Medjahed W, Kajima Mulengi J, Prost J. 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine stimule la prolifération *in vitro* des lymphocytes humains et la sécrétion des interleukines. *Pathologie Biologie.* 2008; 56: 137–142.
- CCPA, Conseil Canadien de Protection des Animaux (1993) Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. Ottawa. 1993; 1: 232–256.
- OCDE. 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, 2000: 19.
- OCDE. Guidance document on Acute Oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on testing and assessment, 2001: 24.
- Claude A. Investigations toxicologiques pour un nouveau médicament. In: Giroud JP et coll. (coordinateurs). Pharmacologie clinique/bases de la thérapeutique. 2<sup>e</sup> édition. Paris: Expansion scientifique française, 1988: 3–14.
- Sirwal IA, Banday KA, Reshi AR, Bhat MA, Wani MM. Estimation of Glomerular Filtration Rate (GFR). *JK Science.* 2004; 6: 121–123.
- Kew MC. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet.* 2000; 355: 591–592.
- Afssaps. 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, 2006: 1–5.