الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supèrieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de La vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master 2 en Biologie

Option : Pharmacologie Expérimentale

Thème

Etude de la néphrotoxicité de la doxorubicine nue et encapsulée dans les liposomes

Membre de Jury :

Président : Dr. Sifour Mohamed
Encadreur : Dr. Lahouel Mesbah
Examinateur : Dr. Rechreche Hocine

Présenté par :

Lariche Nessrine
Brihoum Hadjer

Année Universitaire : 2009- 2010

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions **DIEU** le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donnée durant toutes nos années d'études.

Nous tenant à remercier très chaleureusement Dr. ***Mesbah Lahouel***, promoteur de ce travail, qui nous a offert l'opportunité de réaliser ce modeste travail et qui, tout au long de celui-ci, nous a guidé par ses conseils pertinents et judicieux et ses discussions fructueuses, qui nous a offert sa confiance et sa grande patience, veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent également à Messieurs les membres de jury : ***Mohamed Sifour*** et ***Hocine Rechreche*** d'avoir bien voulu juger ce travail, et qui ont apporté tous leurs soins dans l'évaluation de ce travail.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements, et nos reconnaissances toutes particulières et gratitude, au professeur ***Gillian Barratt***, responsable de laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, France et à Mr. ***Mohamed Alyane*** pour sa contribution à la préparation des liposomes de doxorubicine.

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, et notamment à :

- Dr. ***Ali Bey Hamel***, Docteur en anatomie et cytologie pathologique, qui nous a accueilli dans son laboratoire d'histopathologie et qui nous a appris avec rigueur les coupes histologiques rénales. Sans oublier de remercier *Lamia*, *Mouna* et *Samia*.
- Dr. ***Mohamed Maiza***, responsable de laboratoire d'analyses à l'hôpital de Jijel, pour nous avoir bien accueilli dans son laboratoire.
- Dr. ***Mounia Amira***, chef de service de laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital de Taher, pour sa gentillesse, sa grande compétence et son accueil dans son laboratoire.

Nos remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire de biologie de l'université de Jijel: *Houria*, *Linda*, *Widad*, *Nassiha*, *Wazina* et *Samira* pour leurs aides inestimables et plus que précieuses, qu'elles trouvent ici l'expression de notre gratitude.

Que toute personne ayant pris part de près ou de loin à la réalisation de ce travail trouve ici l'expression de nos très vives reconnaissances.

Sincères remerciements

En guise de reconnaissance, nous dédions ce travail

à nos chers pères, à nos chères mères

à nos chers frères et sœurs

à nos familles

ainsi qu'à tous nos amis.

SOMMAIRE

Introduction 1

Analyse bibliographique 3

Partie I. Doxorubicine 4

I.1. Structure de la Doxorubicine 4

I.2. Pharmacocinétique de la Doxorubicine 5

I.3. Métabolisme de la Doxorubicine 5

I.4. Mécanisme d'action de la Doxorubicine 6

Partie II. Doxorubicine liposomale 7

II.1. Intérêt de la vectorisation de la doxorubicine 7

II.2. Choix des vecteurs : intérêt des liposomes 8

II.3. Doxorubicine liposomale pégylée 9

II.3.1. Pharmacocinétique des liposomes 9

II.3.2. Pharmacocinétique de la doxorubicine liposomale pégylée 10

II.3.2.1. Accumulation de Doxorubicine liposomale pégylée dans la tumeur 11

II.3.2.2. Biodisponibilité de Doxorubicine encapsulé 12

II.4. Métabolisme de la Doxorubicine liposomale 12

Partie III. Néphrotoxicité de la doxorubicine nue et encapsulée 13

III. 1. Rappel histologique du néphron 13

III. 2. Mécanisme de la néphrotoxicité de la doxorubicine 13

III.2.1. Doxorubicine, agent causal de la néphrotoxicité 14

III.2.2. Rôle du stress oxydatif dans la néphrotoxicité de la Doxorubicine 15

III.3. Histopathologie de la néphrotoxicité de Doxorubicine 18

III.3.1. Détachement des cellules épithéliales 18

III.3.2. Altérations des cellules épithéliales glomérulaires 18

III.3.3. Fusion des pédicelles 18

III.3.4. Rétraction ischémique glomérulaire 19

III.3.5. Changements tubulaires interstitiels 19

III.3.6. Vacuolisation glomérulaire 19

III.3.7. Nombreux traces de protéines denses 19
III. 4. Evaluation de la néphrotoxicité 19
III.4.1. Marqueurs de la néphrotoxicité 20
III.4.1.1. Mesures des marqueurs exogènes 20
III.4.1.2. Mesures des marqueurs endogènes 20
III.4.1.2.1. Débit de filtration glomérulaire et bilan des dérivés azotés 20
III.4.1.2.2. Bilan potassique 21
III.4.1.2.3. Bilan phosphocalcique 21
III.4.1.2.4. Protéinurie 21
III.4.1.2.5. Enzymurie « γGT » 21
III.4.1.2.6. Cystatine C 21

Matériel et Méthodes 23
I. Matériel 24
I.1. Partie galénique 24
I.1.1. Préparation des liposomes 24
I.1.2. Mesure de la taille 25
I.1.3. Mesure du potentiel zêta 25
I.1.4. Calcul du taux d'encapsulation 26
I.2. Partie biologique 26
I.2.1. Entretien des animaux 26
I.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques 27
II. Méthodes 27
II.1. Dosages biochimiques 27
II.1.1. Dosage de la créatinine sérique et sa clairance 27
II.1.2. Dosage des triglycérides plasmatiques 28
II.1.3. Contrôle urinaire 28
II.2. Dosages tissulaires 28
II.2.1. Dosage de Malondialdehyde (MDA) cytosolique 29
II.2.2. Dosage du glutathion (GSH) cytosolique 29
II.2.3. Préparation de la fraction cytosolique 30
II.2.2.3.1. Mesure de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase cytosolique 30
II.2.2.3.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique 31
II.2.2.3.3. Mesure de l'activité glutathion S- transférase cytosolique 31

II.3. Etude histologique 32
II.4. Analyse statistique 33

Résultats & interprétation 34
I.1. Evolution des taux de créatinine plasmatique 35
I.2. Effet de la doxorubicine sur la clairance de la créatinine 36
I.3. Evaluation des taux de triglycéride sérique 37
I.4. Variations des concentrations en malondialdehyde (MDA) du tissu rénal 38
I.5. Effet de la doxorubicine sur la réserve rénale en glutathion (GSH) 39
I.6. Variations de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) cytosolique 40
I.7. Evolution de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique 41
I.8. Evolution de l'activité enzymatique de la glutathion S transférase (GST) cytosolique. 42
I.9. Evaluation de l'effet de la doxorubicine nue et encapsulée sur la fonction rénale 43
I.10. Résultats d'analyse des urines à l'aide de bandelettes réactives 44
I.11. Examen histopathologique du tissu rénal 45

Discussion & conclusions 49
Conclusion générale 57
Références bibliographiques 60
Annexe 70

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ASC	Aire sous la courbe
CAT	Catalase
CDNB	Chloro-2-4-dinitrobenzène
DTNB	Acide 5-5- dithiobis 2-nitrobenzoique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
FSGS	Glomérulosclérose segmentaire focal primaire
GR	Glomérule rénal
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S- transférase
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
KCL	Chlorure de potassium
LC	Liposome classique
Lipo-HEPC	Liposome- Hexadecylphosphocholine
Lipo-HEPC/Chol	Liposome- Hexadecylphosphocholine / Cholesterol
Lipo-HEPC/Chol/PEG	Liposome-Hexadecylphosphocholine / Cholesterol Polyéthylène glycol
LSS-DOX	Liposomes stériquement stabilisés
MBG	Membrane basale glomérulaire
MDA	Malondialdehyde
NBT	Nitroblue-tetrazolium
$O_2^{\circ -}$	Anion superoxyde
OH°	Radical Hydroxyle
PEG	Polyéthylène glycol

RES	Système réticuloendothélial
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxyde dismutase
T ½	Temps de demi-vie plasmatique
TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
TCD	Tube contourné distal
TCP	Tube contourné proximal
TFG	Taux de filtration glomérulaire
TNB	Acide thionitrobenzoique
Vd	Volume de distribution

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structures des principales anthracyclines: doxorubicine, daunorubicine, épirubicine et idarubicine.....4

Figure 2 : Structure chimique de la Doxorubicine.....4

Figure 3 : Métabolisme de doxorubicine *in vivo*.....6

Figure 4: Structure de base des liposomes.....8

Figure 5 : Structure du polyéthylène glycol (PEG) utilisé pour augmenter la furtivité des particules.....9

Figure 6 : Schéma présentant les mécanismes d'accumulation de LSS-Doxo dans les tumeurs. 12

Figure 7: Cycle d'oxydo-réduction des électrons de l'anthracycline.....16

Figure 8 : Illustration du cycle redox médié par la doxorubicine. Doxorubicine peut également se lier au fer en formant le complexe doxorubicine-fer, qui peut conduire à la formation de ROS et les dommages cellulaires.....17

Figure 9 : Schéma représentant la fusion des pédicelles.....19

Figure 10a: Variations des taux de la créatinine sérique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine (10 mg/kg).....35

Figure 10b : Variations des taux de la créatinine sérique de rats traités par la doxorubicine (10 mg/kg), les liposomes vides (10 mg/kg) et par la doxorubicine liposomale pégylée (10 mg/kg).....35

Figure 11a : Variations des taux de la clairance de la créatinine de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine (10 mg/kg).....36

Figure 11b : Variations des taux de la clairance de la créatinine de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg, les liposomes vides (10 mg/kg) et par la doxorubicine liposomale pégylée (10 mg/kg).....36

Figure 12a : Variations des taux de triglycérides sériques de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg).....37

Figure 12b : Variations des taux de triglycérides sériques de rats traités par la doxorubicine (10 mg/kg), les liposomes vides (10 mg/kg) et par la doxorubicine liposomale pégylée (10 mg/kg).....37

Figure 13a : Variations des taux du MDA cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg).....38

Figure 13b : Variations des taux du MDA cytosolique de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg), les liposomes vides (10 mg/kg) et par la doxorubicine liposomale pégylée (10 mg/kg).....38

Figure 14a : Variations des taux du GSH cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg).....39

Figure 14b : Variations des taux du GSH cytosolique de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg), les liposomes vides (10 mg/kg) et par la doxorubicine liposomale pégylée (10 mg/kg).....39

Figure 15a : Variations des taux de la SOD cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg).....40

Figure 15b : Variations des taux de la SOD cytosolique de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg), les liposomes vides (10 mg/kg) et par la doxorubicine liposomale pégylée (10 mg/kg).....40

Figure 16a : Variations des taux de la CAT cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg).....41

Figure 16b : Variations des taux de la CAT cytosolique de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg), les liposomes vides (10 mg/kg) et par la doxorubicine liposomale pégylée (10 mg/kg).....41

Figure 17a : Variations des taux de la GST cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg).....42

Figure 17b : Variations des taux de la GST cytosolique de rats traités par la doxorubicine (10mg/kg), les liposomes vides (10 mg/kg) et par la doxorubicine liposomale pégylée (10 mg/kg).....42

Figure 18a : Effet de la doxorubicine nue et encapsulée sur les capacités de défense antioxydante enzymatique SOD, CAT (×100), GST et non enzymatique GSH (×50) et sur les taux du MDA au délai de 15 jours.....43

Figure 18b : Effet de la doxorubicine nue et encapsulée sur les marqueurs biochimiques rénaux la créatinine sérique et sa clairance (×200) au délai de 15 jours.....43

Figure 19 : Photomicrographie de l'examen histopathologique des reins contrôles (hématoxyline & éosine × 40).....45

Figure 20 : Photomicrographie de l'examen histopathologique des reins de rats traités par la doxorubicine nue (hématoxyline & éosine).....46

Figure 21 : Photomicrographie de l'examen histopathologique des reins de rats traités par les liposomes vides (hématoxyline & éosine).....47

Figure 22 : Photomicrographie de l'examen histopathologique des reins de rats traités par la doxorubicine liposomale pégylée (hématoxyline & éosine).....48

Introduction

La plupart des agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie provoquent l'inhibition de la prolifération et la mort des cellules tumorales contribuant ainsi à leur efficacité, cette toxicité sélective sur les cellules malignes n'épargne pas les cellules saines comme celles du rein. Dans le cas des anthracyclines telle que la doxorubicine, en plus des propriétés anti-tumorales, elles présentent des effets secondaires notamment une néphrotoxicité généralement attribuée à l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène responsables de complications cliniques associées à une mortalité et à une morbidité importante.

Bien que le champ des applications thérapeutiques soit vaste, il est incontestable que le traitement du cancer constitue une indication prioritaire pour l'utilisation des nanotechnologies comme vecteurs de médicaments anticancéreux afin d'améliorer leurs index thérapeutique. Pour cette raison la doxorubicine a été encapsulée dans des liposomes biocompatibles et biodégradables, ce qui entraîne son accumulation préférentielle dans le site tumoral afin de maximiser l'efficacité et de minimiser la toxicité, sachant que la doxorubicine liposomale pégylée est la plus largement étudiée de ces nouvelles formulations des anthracyclines. Bien que ces vecteurs colloïdaux peuvent réduire la toxicité de ce principe actif, on ne sait pas actuellement est ce qu'ils sont toxiques en eux-mêmes.

L'objectif de notre étude *in vivo* est d'abord d'étudier la présence ou non d'une néphrotoxicité suite à l'utilisation de doxorubicine encapsulé dans des liposomes, ensuite d'évaluer les similarités ou les différences de l'effet des deux formulations de doxorubicine nue et encapsulée sur les cellules rénales, d'effectuer aussi des dosages biochimiques et oxydatifs chez le rat Wistar albinos dans le but d'évaluer sa fonction rénale et enfin de voir les modifications moléculaires et cellulaires pouvant affectées les différentes fonctions et structures néphrotiques par un examen histopathologique.

Analyse bibliographique

Partie I. Doxorubicine

Les anthracyclines sont un groupe d'antibiotiques qui sont parmi les agents chimiothérapeutiques les plus actifs. Ils sont très efficaces contre un large spectre de tumeurs malignes y compris les tumeurs hématologiques et solides à la fois, dont les lymphomes, cancers gastriques, cancers du poumon, les sarcomes et les cancers du sein. Certains antibiotiques anthracyclines couramment utilisés comprennent : la doxorubicine, la daunorubicine, l'épirubicine et l'idarubicine (Rahman et al., 2007). L'hydroxylation du carbone en position 14 (C 14) donne des dérivés de Doxorubicine (Voutsadakis, 1998).

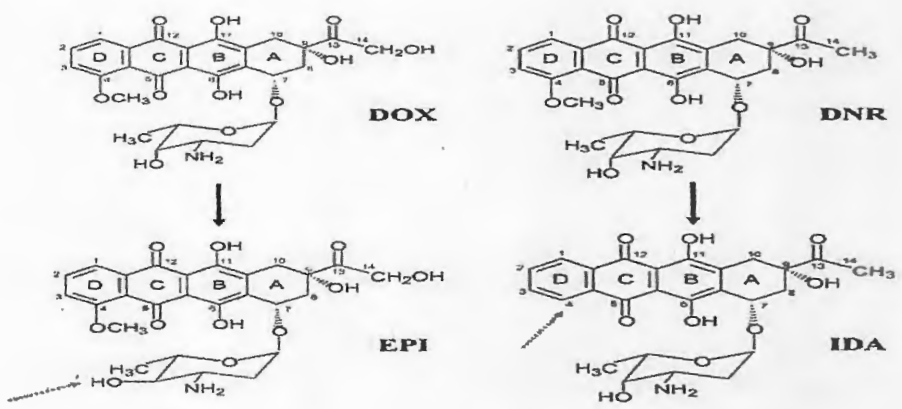


Figure 1 : Structures des principales anthracyclines: doxorubicine, daunorubicine, épirubicine et idarubicine (Minotti et al., 2004).

I.1. Structure de la doxorubicine

La doxorubicine est la première anthracycline isolée des pigments produits par *Streptomyces peucetius* au début des années 1960 et introduite dans le traitement du cancer en 1969. Elle est partagée en deux moitiés : un composé aglycone et un sucre. L'aglycone se compose d'un tétracycle avec des groupes adjacents de quinone- hydroquinone dans les cycles de C-B, un substituant méthoxy en C-4 dans le cycle D, et une chaîne latérale courte en C-9 avec un carbonyle en C-13. Le sucre, appelé daunosamine, est attaché par une liaison glycosidique au carbone 7 du cycle A et se compose d'un 3-amino-2, 3,6 - trideoxy-L- fucosyl. La chaîne latérale de la doxorubicine se termine avec un alcool primaire (Minotti et al., 2004).

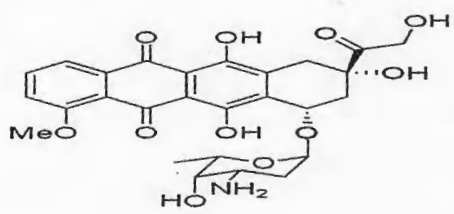


Figure 2 : Structure chimique détaillée de la Doxorubicine (Minotti et al., 2004).

I.2. Pharmacocinétique de la Doxorubicine

Le profil pharmacocinétique et l'activité pharmacologique de la doxorubicine répondent à un modèle biexponentiel. La cinétique plasmatique après une administration par bolus présente une diminution initiale rapide, suivie d'une autre diminution lente de la concentration plasmatique (Wilkinson et Mawer, 1974). Les concentrations initiales sont 50 fois supérieures à celles observées au début de la phase terminale (Greene et al., 1983). Cette diminution du niveau plasmatique a été attribuée à la capacité rapide d'accumulation intracellulaire du médicament dans les tissus suivie d'une libération lente à partir des tissus ainsi qu'à son élimination (Wilkinson et Mawer, 1974). Ces constations ont été confirmées aussi bien chez l'animal que chez l'homme. En effet, il a été montré qu'après une administration intraveineuse chez les rongeurs, la doxorubicine est rapidement éliminée du plasma et se concentre dans le foie, la rate, les reins, les poumons et le cœur. Alors que chez l'être humain, son élimination plasmatique est également rapide, le volume de distribution a été estimé à 25 l / kg, suggérant un degré significatif de captation par les tissus (Speth et al., 1988). Ce grand volume de distribution, lorsqu'il est combiné avec le taux relativement rapide de la clairance de la circulation, donne comme résultat une faible concentration du médicament dans la tumeur et une toxicité importante pour les tissus normaux (Drummond et al., 1999).
Cette cinétique de disparition de la doxorubicine pourrait être décrite par une équation bi-exponentielle avec un temps de demi-vie initiale de 8 min et un temps de demi-vie terminale de 30 heures, donc la phase terminale peut fournir 75% de l'exposition totale du médicament et elle maintient des concentrations cytotoxiques pendant plusieurs jours, depuis la demi-vie de 30 heure (Greene et al., 1983). La doxorubicine et ses métabolites sont majoritairement excrétés par voie biliaire; 41 % de la dose injectée l'est principalement sous forme inchangée, sur une période de 7 jours (Riggs et al., 1977), alors que l'élimination urinaire est faible et représente, en moyenne, 5 % de la dose administrée (Marcot et al., 1997).

I.3. Métabolisme de la Doxorubicine

Dans la circulation, la doxorubicine peut être convertie soit en métabolites inactifs le "deoxyaglycones" qui sont la doxorubicine aglycone et le deoxydoxorubicin aglycone, ou en métabolites actifs le "doxorubicinol" et représente la voie privilégié du métabolisme. La doxorubicine est métabolisée dans le foie par la voie de cytochrome P-450, donnant naissance à des métabolites toxiques (Lahouel et Fillastre, 2004). La réduction d'un groupe carbonyle

dans la chaîne latérale de la doxorubicine par une aldo-cetoréductase (NADPH-dépendant oxydoréductase) (Minotti et al., 1998), qui se trouve dans tous les tissus et surtout le rein (Bachur et al., 1974), donne la formation d'un métabolite alcoolique secondaire : le doxorubicinol qui est le principal métabolite trouvé dans le plasma, la bile et l'urine. Il peut être ensuite métabolisé en doxorubicinol aglycone ou préférentiellement en deoxydoxorubicinol aglycone. Enfin, le deoxydoxorubicinol aglycone peut être convertie en métabolites plus polaires d'o-sulfate ou d'o-glucoronide (Takanashi et Bachur, 1976).

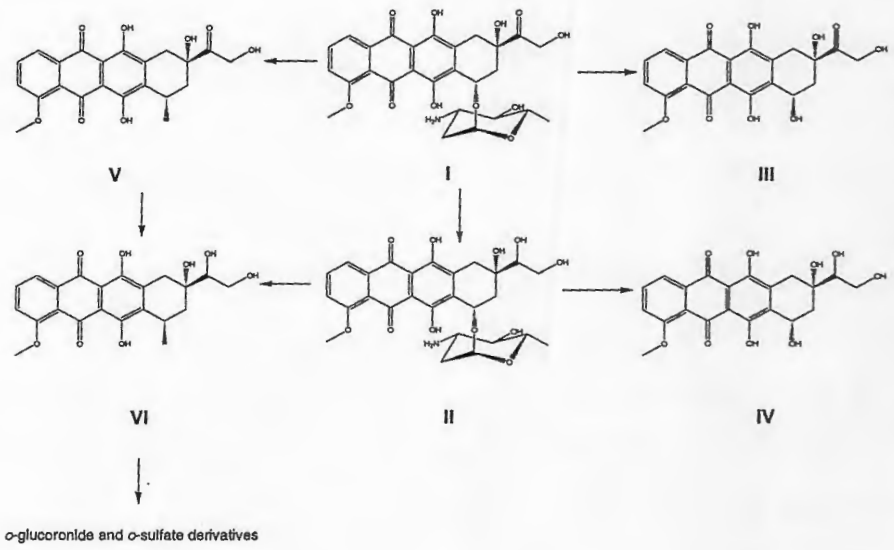


Figure 3 : Métabolisme de doxorubicine *in vivo :* Doxorubicine (I), Doxorubicinol (II), Doxo aglycone (III), deoxydoxorubicin aglycone (V), doxorubicinol aglycone (IV),deoxydoxorubicinol aglycone (VI) (Drummond et al., 1999).

Le doxorubicinol présente une activité cytotoxique in vitro, mais plus faible que celle de la molécule mère (de 5 à 28 fois moindre suivant la lignée cellulaire) (Olson et al., 1988). La doxorubicine et ses métabolites demeurent indétectables dans le liquide céphalorachidien humain prélevé à divers moments après l'administration du médicament (Raguenez-Viotte et al., 1988) mais présente à des concentrations importantes et assez constantes dans les leucocytes circulants (Andersen et al., 1999).

I.4. Mécanisme d'action de la Doxorubicine

En dépit de l'utilisation clinique à grande échelle, les mécanismes d'actions de doxorubicine dans les cellules cancéreuses restent un sujet de controverse. Les principaux mécanismes sont : l'intercalation dans l'ADN, ce qui inhibe la synthèse des macromolécules par une inhibition de la réplication et la transcription de l'ARN; la production des radicaux libres, provoquant des dommages de l'ADN ou des peroxydations lipidiques ; la liaison à l'ADN et l'alkylation; un cross-linking de l' ADN; l'interférence avec le déroulage de l'ADN ou avec la séparation des brins d'ADN et de l'activité hélicase ; l'effet membranaire direct; l'initiation

des dommages à l'ADN via l'inhibition de la topoisomérase II; et l'induction de l'apoptose comme réponse à l'inhibition de la topoisomérase II (Gewirtz , 1999).

Partie II. Doxorubicine liposomale

La nanotechnologie représente aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor. Ce nouveau domaine se situe à l'interface de 03 grandes disciplines : la biologie, la physique et la chimie (Goutayer, 2008). Elle peut être définie comme la science et la génie impliquée dans la conception, la synthèse, la caractérisation et l'application des matériaux et des dispositifs plus petits, dont l'organisation fonctionnelle, dans au moins une dimension, est à l'échelle nanométrique, ou un milliardième de mètre (Rahman et al., 2007). Normalement, les nanoparticules sont plus ou moins uniformément répartis dans tout le corps et atteignent la zone cible du médicament qui peut franchir de nombreux autres organes, les cellules, les compartiments intracellulaires,...etc., où il peut être partiellement inactivé. Pour surmonter ce problème, une forte concentration du médicament doit être administrée, ce qui a pour potentiel de provoquer des complications indésirables. La solution idéale au tel problème est le ciblage de médicaments en utilisant des supports appropriés tels que les polymères synthétiques, les microsphères, les micelles, les liposomes (Pozanansky et Juliano, 1984). Les formulations pharmaceutiques liposomales offrent la possibilité d'accroître l'efficacité tout en réduisant les effets secondaires toxiques des médicaments cytotoxiques de chimiothérapies. À l'heure actuelle, plusieurs médicaments anticancéreux sous forme liposomale tell que « la doxorubicine liposomale » sont disponibles à la clinique ou sont à un stade avancé de développement clinique (Park et al., 2004; Hofheinz et al., 2005).

II.1. Intérêt de la vectorisation de la doxorubicine

Par définition, un vecteur est une structure capable de véhiculer un principe actif tel que la doxorubicine tout en modifiant sa distribution tissulaire et/ou cellulaire ou ses interactions avec des cellules cibles. Cette vectorisation permet d'une part d'éviter l'injection directe du médicament dans l'organisme et d'autre part d'améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques du principe actif après encapsulation.

Une association de doxorubicine à des macromolécules peut être réalisée de façon covalente ou par interaction physique, ce qui permet alors : d'améliorer sa stabilité, de ralentir son

métabolisme et son élimination, d'améliorer son intensité d'action et de réduire sa toxicité (Socha, 2008).

II.2. Choix des vecteurs : intérêt des liposomes

Les liposomes sont des cristaux liquides lyotrope composés par des matériaux relativement biocompatibles et biodégradables et sont constitués d'un noyau aqueux piégé par un ou plusieurs bicouches naturels et / ou des lipides de synthèse (Goyal et al., 2005) de 50 à 100 nm de diamètre. Si le médicament est encapsulé dans le cœur ou dans la bicouche de liposome ceci dépend de ces caractéristiques et le processus d'encapsulation. En général, les médicaments solubles dans l'eau sont encapsulés dans le cœur aqueux central, tandis que des médicaments liposolubles sont directement intégrés dans la membrane lipidique (Zamboni, 2008).

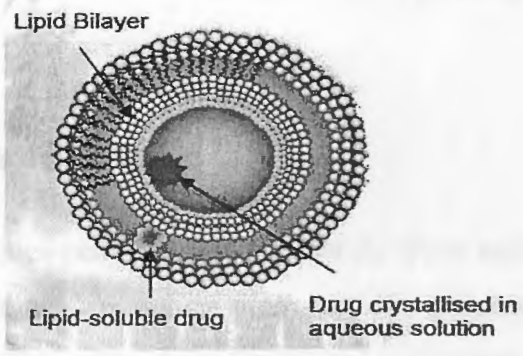


Figure 4 : Structure de base des liposomes (Immordino et al., 2006)

Il y a trente ans, Alec Bangham découvre que les phospholipides forment de vésicules fermés dans l'eau de sorte que les liposomes sont spontanément formés lorsque les phospholipides sont dispersés en milieu aqueux (Lasic et Papahadjopoulos, 1995). L'utilité médicale de ce que sont maintenant appelées liposomes classiques (LCs) est limitée par leur adsorption rapide par les cellules phagocytaires du système immunitaire (Lasic et Papahadjopoulos, 1995). La stabilité de la bicouche membranaire ainsi que la rétention de drogues incorporées dépend de ce fait sur la composition des lipides et de cholestérol des membranes liposomales (Huwyler et al., 2008). Les avantages potentiels des formulations liposomales sont de deux ordres: d'abord, les concentrations des médicaments lipophiles dans les milieux aqueux peuvent être augmentées considérablement au moyen de ces formulations. Deuxièmement, les transporteurs liposomales ont un effet protecteur sur les drogues incorporées en empêchant leur dégradation enzymatique (Krishna et Mayer, 1999).

caractéristiques physico-chimiques, comme la taille, la charge de surface, les lipides membranaires, et la stabilisation stérique, ainsi que sur la dose administrée et la voie d'administration. Après une administration IV, les liposomes classiques ont une cinétique non linéaire et saturable, la cinétique dose-dépendante des LCs donne relativement un taux de clairance relativement rapides pour les liposomes à faibles doses (Drummond, 1999). La pharmacocinétique de ces agents dépend du transporteur et non de la molécule mère jusqu'à ce que le médicament soit libéré par le transporteur (Laginha et al., 2005). Le médicament qui reste encapsulés dans les liposomes ou lié à un polymère conjugué est une prodrogue inactive, et donc le médicament doit être libéré du transporteur pour être actif (Zamboni et al., 2004 ; Zamboni, 2005).

Après que le médicament est libéré de son transporteur, sa pharmacocinétique est la même que celle après l'administration de sa forme conventionnelle (Zamboni, 2005). Les liposomes sont éliminés de la circulation sanguine par les macrophages du système réticuloendothélial (RES), en particulier celles du foie et la rate (Senior, 1987). L'opsonisation par des protéines sériques telles que le fragment C3b du complément, glycoprotéine b2, et la portion Fc des molécules d'IgG joue un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'autorisation subséquente par les macrophages du RES (Senior, 1987 ; Devine et Marjan, 1997).

II.3.2. Pharmacocinétique de la doxorubicine liposomale pégylée

Un des avantages les plus significatifs des liposomes stériquement stabilisés de doxorubicine « LSS-DOX » est la pharmacocinétique linéaire et non saturable. Chez l'homme, LSS-DOX ou doxorubicine liposomale pégylée donne un maximum de 50 fois moins un volume de distribution (Vd) similaire à des valeurs du volume de plasma (de 200 à 4.5 l) (Allen, 1994), c'est à dire que le LSS à libération prolongée a un volume de distribution (Vd) pour la doxorubicine qui n'est pas significativement différent du volume sanguin total, indiquant que le médicament est généralement limitée à la circulation systémique (Drummond et al., 1999), également LSS-DOX a une diminution de 20 fois de la clairance plasmatique de 22 à 0.1 L/heure et près de 100 fois une augmentation de l'aire sous la courbe (ASC) temps-concentration (Allen, 1994).

Dans les liposomes pégylés de doxorubicine, une corrélation a été observée entre la phase de transition (Tm) de la composante de phospholipides, la stabilité de la formulation et les taux plasmatiques du médicament in vivo (Gabizon et al., 1993) ainsi, les LSS sont plus pliables et

peuvent être utilisés avec des lipides en phase liquide pour obtenir de longue temps de circulation et un taux élevé de liposomes dans la tumeur (Drummond et al., 1999). L'attachement du PEG à la surface d'un liposome empêche l'absorption de liposome contenant doxorubicine par le RES, donc ces liposomes ont une longue demi-vie dans la circulation par rapport à la doxorubicine libre, donnant une grande partie de l'aire sous la courbe (ASC) plasmatique attribuée à la phase terminale prolongée (Papahadjopoulos et Gabizon, 1995; Gabizon et Martin, 1997).

Les temps de demi-vie plasmatiques (t ½) chez le rat ont été trouvés entre 22 et 23,6 h (Mayhew et al., 1992), tandis que celles de l'être humain sont approximativement de 45 h (Gabizon et al., 1994). Bien que le t ½ ait été jugé indépendant de la dose pour LSS-DOX, la doxorubicine a une clairance plasmatique de 560 fois plus lente chez l'homme quand elle est encapsulée dans LSSs. Chez le rat, l'ASC est 60 fois plus élevé que celle de doxorubicine libre, et cette augmentation est de 368 fois plus chez les lapins (Working et Dayan, 1996).

- **Distribution tissulaire de Doxorubicine liposomale pégylée**

En partie, en raison de la taille du transporteur, LSS-DOX possède une distribution tissulaire altérée par rapport à doxorubicine libre. Le Vd pour doxorubicine libre est élevé dans toutes les espèces étudiées, ce qui indique une large distribution tissulaire. Toutefois, lorsqu'ils sont administrés sous forme liposomale, le Vd a été réduit de 60 fois à des valeurs proche du volume plasmatique. La taille relativement importante des transporteurs liposomales (45-150 nm) les empêche de passer par les pores de 2 nm de diamètre trouvés dans l'endothélium des vaisseaux sanguins dans la plupart des tissus sains, voire les pores de 6 nm trouvée dans les veinules post-capillaires (Seymour, 1992).

II.3.2.1. Accumulation de Doxorubicine liposomale pégylée dans la tumeur

Pour cibler les tumeurs, la doxorubicine liposomale pégylée doit être capable de quitter le sang et d'atteindre la tumeur. Toutefois, en raison de leur taille, ces liposomes ne peuvent pas subir normalement le passage transcapillaire. L'accumulation des liposomes ou des macromolécules dans les tumeurs est le résultat d'une fuite à travers la microvascularisation tumoral et un soutien lymphatique avec les facultés affaiblies de la zone tumorale (Seymour, 1992). Cet effet est souvent désigné sous le nom de la perméabilité améliorée et l'effet de rétention (« EPR phénomène »). Une fois dans les tumeurs, les liposomes non ciblés sont localisés dans le tissu interstitiel entourant les cellules tumorales (Huang et al., 1992; Yuan et

al., 1994). Les liposomes n'ont pas été observés dans les cellules tumorales, même si elles ont été observées dans les macrophages résidant la tumeur. La distribution limitée de LSS-DOX dans l'interstitium tumoral est le résultat d'une pression interstitielle élevée et un grand espace interstitiel par rapport aux tissus normaux (Jain, 1990). L'absence de fonctionnement lymphatique, en combinaison avec une pression interstitielle élevée, résulte le piégeage de ces liposomes dans la zone tumorale. Le résultat est un rythme relativement lent de l'élimination à partir de la tumeur.

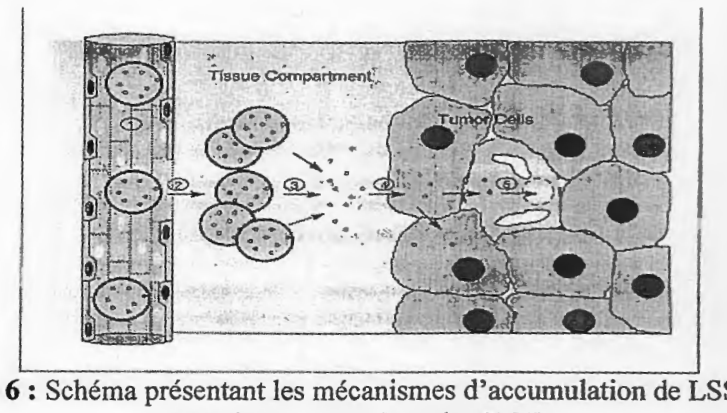


Figure 6 : Schéma présentant les mécanismes d'accumulation de LSS-Doxo dans les tumeurs (Martin, 1997).

II.3.2.2. Biodisponibilité de Doxorubicine encapsulée

Nous définissons la biodisponibilité dans le cas des transporteurs liposomale comme la quantité de médicament libre qui est capable de franchir les limites du transporteur et est donc disponible pour la redistribution dans les tissus voisins et dans la tumeur. Pour les liposomes de doxorubicine à libération lente, le médicament à la capacité de fuir très lentement son vecteur et donc être similaire à une perfusion lente en particulier près des cellules cancéreuses (Vaage et al., 1998). La doxorubicine livrée via LSSs réside immédiatement à proximité des capillaires et veinules de la tumeur à un temps très court (1 h) (Vaage et al., 1998). À 24 h, la doxorubicine s'était échappée des liposomes et a été trouvé au sein de la tumeur dans un modèle indiquant la diffusion hors des capillaires et veinules. La doxorubicine ne devient biodisponible qu'en arrivant à la tumeur.

II.4. Métabolisme de la Doxorubicine liposomale

Dans deux études distinctes (Gabizon et al., 1994 ; Northfelt et al., 1996), le doxorubicinol n'a pas été observée dans le plasma à tout moment après l'administration de LSS- DOX. Dans les formulations contenant des phospholipides insaturés, les fuites rapide de doxorubicine du

liposome et du doxorubicinol a été détecté dans le plasma à des temps aussi court que 30 min (Gabizon et al., 1991; Embree et al., 1993). Sa protection de l'inactivation par des enzymes plasmatiques presque certainement augmenter le pourcentage de médicament qui arrive à la forme active dans le site tumoral, à ce moment là, le métabolisme de LSS-DOX prend celui de la forme libre.

Partie III. Néphrotoxicité de la doxorubicine nue et encapsulée

III.1. Rappel histologique du néphron

Le néphron est l'unité fonctionnelle rénale, il est composé d'un glomérule qui est un bouquet de capillaires, d'un tube contourné proximal, de l'anse de Henlé avec une partie grêle et une partie plus épaisse : la branche ascendante, et le tube distal (Seguy, 1996).

III.2. Mécanisme de la néphrotoxicité de la doxorubicine

La néphrotoxicité peut être définie de façon très large comme l'ensemble des altérations fonctionnelles ou structurelles rénales, induites directement ou indirectement par des agents chimiques (ou leur métabolites), qui sont absorbés dans l'organisme quelle qu'en soit la voie de pénétration. L'utilisation de la doxorubicine a été limitée pour ses diverses toxicités, en particulier cardiaques, rénales, hématologiques et testiculaires (Liu et al.,2007) la doxorubicine est néphrotoxique (Malarkodi et al., 2003).

Une étude à long terme de ces changements histopathologiques chez le rat a montré une lésion rénale sévère avec les caractéristiques de la maladie rénale chronique progressive chez l'homme (Lin et al., 2007). La doxorubicine lèse sélectivement les cellules épithéliales glomérulaires chez les rongeurs et cause un syndrome néphrotique dans quelques jours lors de l'administration d'une dose unique (Bertani et al., 1982) et augmente aussi la perméabilité capillaire glomérulaire et l'atrophie tubulaire (Mohan et al., 2010). Ce modèle de syndrome néphrotique se caractérise par une protéinurie, une hypoalbuminémie, une dyslipidémie, une hypercoagulabilité, ascite et œdème périphérique, qui ne sont évidentes que plusieurs semaines après le traitement. Bien qu'il ait été suggéré que la doxorubicine pourrait aussi causer une toxicité tubulaire, il est généralement admis que les effets tubulaires d'une telle exposition sont mineurs, de courte durée et sans importance (Gordon et Peter, 1995).

Le mécanisme moléculaire par lequel la doxorubicine cause des dommages rénaux n'est pas connu (Malarkodi et al., 2003). Cependant, l'inhibition de la synthèse d'ADN et la formation

de radicaux oxygénés suivie de la peroxydation lipidique dans le rein ont été impliquées dans la toxicité de la doxorubicine (Park, 2003).

Des études expérimentales et cliniques ont suggéré que l'augmentation de stress oxydatif associé par un statut déficient de la défense antioxydante, lance une cascade de réactions responsable de la néphrotoxicité induite par la doxorubicine (Ibrahim et al., 2009).

III.2.1. Doxorubicine, agent causal de la néphrotoxicité

La néphropathie induite par la doxorubicine se distingue parce qu'elle est le modèle prototypique expérimental de la glomérulosclérose segmentaire focal primaire (FSGS), l'une des principales causes d'insuffisance rénale au stade final. Ce trait est pertinent pour les études sur les glomérulopathies parce que de nombreuses études indiquent que les podocytes glomérulaires sont le site de l'agression initiale dans ce modèle (Wang et al., 2000). Une exposition directe des reins à la doxorubicine lors de l'administration par IV est une exigence pour le développement de la néphropathie, ce qui suggère que ce trait est indépendant du métabolisme des médicaments extrarénaux (Bertani et al., 1986). Sur des souches sensibles des rats et des souris, une injection IV unique de doxorubicine produit une protéinurie, et une progression de la maladie rénale dans 5-7 jours d'exposition (Zheng et al., 2005). Le dénominateur commun de la néphropathie expérimentale, qui reproduit des changements minimes de la maladie et diverses maladies rénales primaires et secondaires, est un dysfonctionnement glomérulaire entraînant une protéinurie massive (Nakhoul et al., 2005). La pathologie ultrastructurale des reins exposés à la doxorubicine, montre des modifications rapide au niveau des cellules glomérulaire épithéliales, conduisant à une perméabilité accrue des protéines (Bach et al.,1997).

Les études en microponction chez l'animal, ont montré que la protéinurie est originaire principalement du glomérule juxtamédullaire, indiquant que les glomérules corticaux sont moins sensibles à l'effet des composés toxiques (Soose et al.,1988). Ainsi l'atteinte glomérulaire était associée à un effet stimulant sur le métabolisme glomérulaire, ce qui était beaucoup plus prononcé dans la juxtamédullaire puis dans le glomérule cortical.

Le mécanisme de base de cette hétérogénéité des lésions glomérulaires n'est pas entièrement compris, mais peut être liée à des différences de pression d'oxygène dans le cortex externe et interne. La pression partielle de l'oxygène à l'intérieur de cortex est considérablement plus élevée que celle de la région sous-capsulaire, ce qui renforcerait le stress oxydatif dans les composants membranaire médié par les radicaux semiquinones de doxorubicine, dans les

cellules épithéliales glomérulaires et juxtamédullaires en raison d'un approvisionnement plus abondant d'oxygène. L'effet néphrotique précoce, qui est reflété par une diminution de l'activité ATPase glomérulaire, est médié par la formation de radicaux libres. Le stress oxydatif des composés membranaire semble réduire la perméabilité de la barrière glomérulaire à l'eau (Barbey et al., 1989). Aussi des recherches suggèrent que Platelet activating factor (PAF) peut être un médiateur de la néphrotoxicité induite par doxorubicine. PAF, synthétisée par les cellules mésangiales, induit la perte de charge anionique glomérulaire (Egido et al., 1987). Une coloration de fer Colloïdale d'une biopsie rénale a révélé une perte de polyanions glomérulaire dès 3h et une perte très marquée à 28h après l'administration de doxorubicine. Les polyanions sont totalement absents dans le 13 éme jours et sont encore indétectables à 28 jours. Ainsi, la perte des charges polyanioniques associé à la couche d'acide sialique précèdent les modifications ultrastructurelles et l'apparition d'une protéinurie (Bertani et al., 1982)

III.2.2. Rôle du stress oxydatif dans la néphrotoxicité de la Doxorubicine

Ces dernières années, le système oxydatif et les modalités thérapeutiques, liées aux maladies rénales ont été étudiées et son importance a été soulignée (Bulucu et al., 2000).

Dans des conditions physiologiques, les ROS intracellulaire agissent comme un second messager à une variété de facteurs de croissance, ce qui induit l'activation des molécules de signalisation en aval (Zhu et al., 2006). Toutefois, lorsque les ROS sont excessivement produites, par exemple, dans le cadre de l'administration de la doxorubicine, elle devient nocive et provoque des dommages au niveau des composantes cellulaires, et des lipides membranaires de la membrane plasmique et des mitochondries (Hou et al., 2009). Les ROS ont été considérées comme ayant un rôle dans la pathogenèse des maladies glomérulaires, tel que les maladies entraînant des changements minimes et des néphropathies membranaires, insuffisance rénale aiguë post-ischémique ou toxique et la pyélonéphrite (Ichikawa, 1994). Les cellules rénales, les neutrophiles ou d'autres cellules dans la circulation peuvent être les sources d'espèces réactives de l'oxygène (Alis et al., 2008).

Les ROS produits dans les reins ont été associés à des lésions tissulaires et ils sont compensés par le système de défense anti-oxydante du rein. Deux voies différentes de formation de radicaux libres par la doxorubicine ont été décrites:

* La première, implique la formation d'un radical libre semiquinone: Un ajout d'un électron à la moitié quinone dans l'anneau C de la doxorubicine et d'autres anthracyclines, est connue depuis longtemps pour provoquer la formation d'un semiquinone qui régénère rapidement son quinine mère par la réduction de l'oxygène à une espèce réactive de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde (O2°⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H2O2).
Ce cycle est soutenu par un certain nombre de NAD(P)H oxidoreductases (cytochrome P450 ou b5 reductase, NADH mitochondrial déshydrogénase, la xanthine déshydrogénase, le monoxyde d'azote synthase endothéliale) (Vasquez-Vivar et al., 1997; Minotti et al., 1999).
Au cours de ce cycle, le semiquinone peut être transformé en 7-deoxyaglycone.
En raison de leur solubilité augmenté dans les lipides, l'aglycone s'intercale dans les membranes biologiques et forment des ROS à proximité des cibles sensibles (Licata et al., 2000).

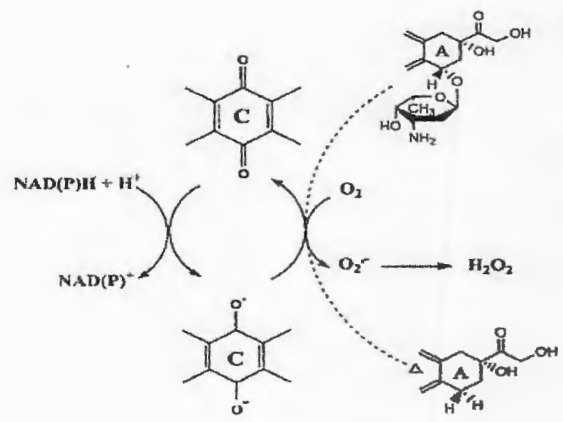


Figure 7: Le cycle d'oxydo-réduction des électrons de l'anthracycline (Minotti et al., 2004).

* Dans la seconde voie, les radicaux libres de doxorubicine sont produits par un mécanisme non enzymatique qui implique des réactions avec le fer :

Un électron du cycle redox de doxorubicine est également accompagné d'une libération de fer à partir des réserves intracellulaires; interaction de liaison du ligand de doxorubicine avec une libération du fer, se traduit par la formation des complexes médicament-fer qui convertissent O2°⁻ et H_2O_2 à des radicaux hydroxyles plus puissants (OH°) (Myers, 1998; Minotti et al., 1999). Le complexe Fer-doxorubicine cause des dommages oxydatifs d'une variété de tissus, y compris les reins. OH° est l'espèce chimique la plus réactive responsable de la peroxydation lipidique, causant des dommages irréversibles de la structure et de la fonction membranaire (Abdel-Wahab et al., 2003) conduisant à la libération d'aldéhydes réactifs, tels que le malonyldialdéhyde (MDA) et la diminution de GSH contenus dans les reins (Hou et al.,

2009). L'oxydation lipidique est une étape dans la cascade de la néphrotoxicité de la doxorubicine, conduisant à des altérations du métabolisme dans les cellules épithéliales, ce qui pourrait conduire à des altérations structurelles dans la barrière de filtration glomérulaire (Bach et al., 1997).

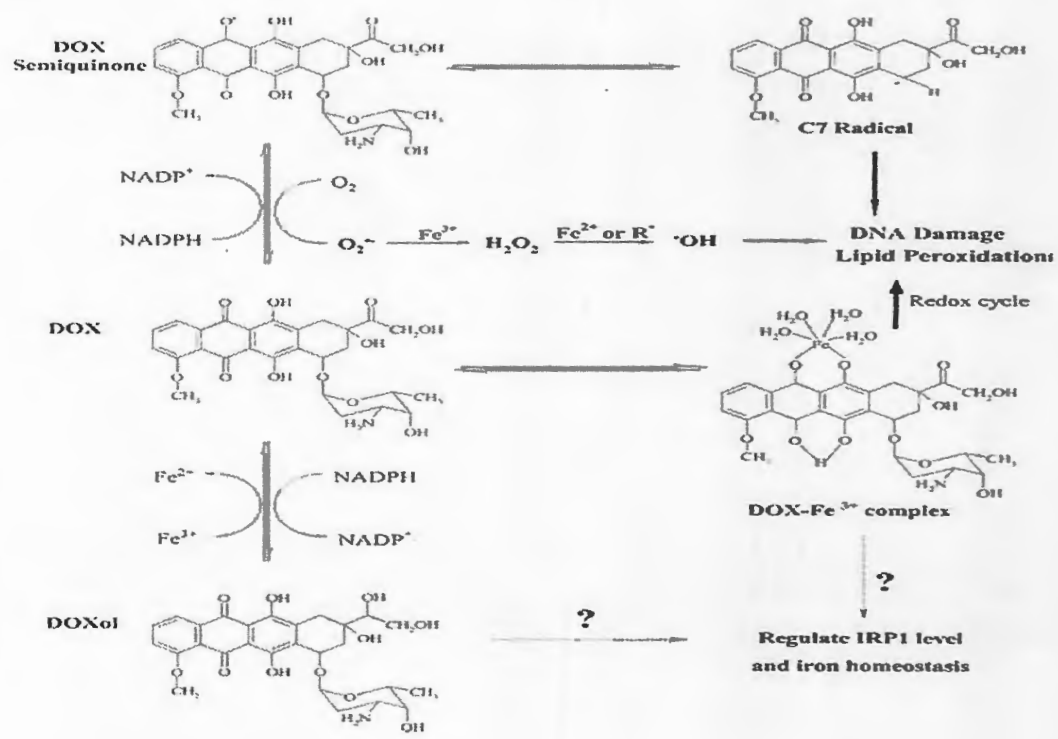


Figure 8 : Illustration du cycle redox médié par la doxorubicine. Doxorubicine peut également se lier au fer en formant le complexe doxorubicine-fer, qui peut conduire à la formation de ROS et les dommages cellulaires (Xu et al., 2005).

Les ROS pourraient affecter la chaîne de transport d'électrons et de canaliser l'énergie ainsi qu'ils pourraient favoriser l'initiation de la mort cellulaire programmée (apoptose) (Ibrahim et al., 2009), par une libération favorable de cytochrome C et par conséquent une formation d'un complexe « apoptosome » à travers une sur-régulation de Bax ou par une sous-régulation de Bcl-XL (Minotti et al., 2004). L'apoptose joue un rôle important dans la pathogenèse de différentes maladies rénales et l'intervention de l'apoptose cellulaire et l'apoptose lié aux gènes peut être une méthode efficace pour prévenir et guérir les maladies rénales (Liu et al., 2007). L'apoptose des cellules tubulaires rénales a été rapportée dans des rats traités par doxorubicine est considéré comme l'un des éléments clés de l'atrophie tubulaire, qui est une des caractéristiques des maladies rénales chroniques (Lin et al., 2007). Des résultats montrent également que la doxorubicine augmente le contenu nitrite de rein (Ibrahim et al., 2009).

Les concentrations plasmatiques de MDA et les activités du SOD tissulaire ont été trouvés significativement plus élevées chez le rat néphrotique par rapport à celles des contrôles.
De même, l'étude de Dogra et al. démontre que dans le syndrome néphrotique, il y avait une diminution de la capacité de piégeage des radicaux libres de plasma, qui est inversement corrélée à l'hypoalbuminémie (Dogra et al., 2001).

III.3. Histopathologie de la néphrotoxicité de Doxorubicine

Les lésions rénales d'animaux traités par la doxorubicine comprennent:

III.3.1. Détachement des cellules épithéliales.

III.3.2. Altérations des cellules épithéliales glomérulaires ; des changements ultrastructuraux sévères des cellules épithéliales glomérulaires qui se produisent et constituent la base de l'augmentation de la perméabilité glomérulaire et de la protéinurie. Dans l'espace urinaire les cellules épithéliales montrent une hyperactivité, avec la dilatation des citernes du réticulum endoplasmique, nombreux lysosomes denses, et des projections de la membrane plasmatique. La fusion de ces saillies, forme de grandes vacuoles comme si l'expansion de la membrane plasmique s'est produite (Raguenez-Viotte et al., 1988).
Les cellules épithéliales glomérulaires montrent une déformation de la forme, des formations de vacuole, un détachement de la membrane plasmique de la membrane basale glomérulaire (MBG) et une augmentation des organites cellulaires. Parallèlement à ces modifications, la distribution anormale des microfilaments intracytoplasmiques de 5-6 nm de diamètre et de la fusion des pédicelles adjacents à la MBG (Ito et al., 1986).

III.3.3. Fusion des pédicelles ; la fusion des pédicelles des cellules épithéliales viscérales a été la première lésion observée en microscopie électronique dès le 4ème jour suivant l'injection de doxorubicine. Ces fusions focales évoluent et deviennent plus complètes après 21 à 28 jours (Raguenez-Viotte et al., 1988). La fusion des pédicelles s'observe dans toutes les glomérulopathies accompagnés d'une protéinurie liée à une perte des charges anioniques des podocytes (Wang et al., 1991). Les caractéristiques du modèle clinique et pathologique sont très similaires à celles décrites chez l'homme avec des changements minimes de syndrome néphrotique. Une diminution de la longueur des pores épithéliaux apparaissait de façon concominante avec l'élargissement des pédicelles ce qui est en concordance avec l'hypothèse d'une fusion des pédicelles responsable de la diminution de la perméabilité capillaire glomérulaire (Bohman et al., 1984).

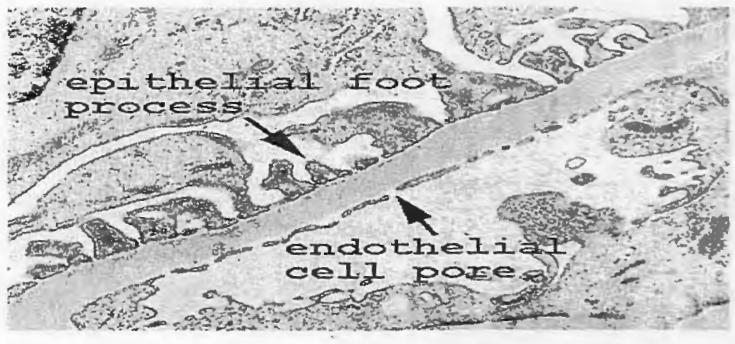


Figure 9 : Schéma représentant la fusion des pédicelles (Farquhar, 2006).

III.3.4. Rétraction ischémiques glomérulaire ; en microscopie optique, beaucoup de glomérules montrent des effondrements (collapse) de type ischémique de la touffe glomérulaire avec un épaississement de la capsule de Bowman après traitement par la doxorubicine (Raguenez-Viotte et al., 1988).

III.3.5. Changements tubulaires interstitiels ; le degré de volume interstitiel est sensiblement augmenté avec le temps, indiquant la gravité de l'expansion interstitielle tubulaire, une augmentation focale dans la résorption sous forme de gouttelettes dans les cellules tubulaires et des moulages intraluminale et après 4 semaines de traitement, les tubules affichent d'importantes modifications, notamment une diminution de la hauteur des cellules de l'épithélium tubulaire, une perte de bordure en brosse, une vacuolisation et une infiltration modérée des monocytes interstitielle (Wang et al., 2000).

III.3.6. Vacuolisation glomérulaire; réduction de la taille des glomérules avec plusieurs vacuoles et l'effondrement de la touffe.

III.3.7. Nombreux traces de protéines denses "hyalins" ont été observés dans la lumière des tubules rénaux avec prédominance dans la zone juxtamédullaires (Park, 2003), un épaississement de la membrane basale glomérulaire, une surcharge lipidique mesangial et une sclérose glomérulaire focal (SGF) (Raguenez-Viotte et al., 1988).

III.4. Evaluation de la néphrotoxicité

De la diurèse à l'analyse protéomique urinaire, de très nombreux marqueurs de souffrance rénale peuvent être mis en évidence. Les méthodes d'étude de la néphrotoxicité des produits chimiques in vitro, et in vivo permettent la recherche mécanistique sur la toxicité des cellules

cibles, de l'examen préalable de nouveaux composés pour leur néphrotoxicité potentielle (Bababunmi et al., 1991).

III.4.1. Marqueurs de la néphrotoxicité

III.4.1.1. Mesures des marqueurs exogènes

Le taux de filtration glomérulaire est traditionnellement considéré comme le meilleur indice de la fonction rénale (Levey et al. 1999). La clairance est la méthode de référence pour étudier la filtration glomérulaire.

III.4.1.2. Mesures des marqueurs endogènes

III.4.1.2.1. Débit de filtration glomérulaire et bilan des dérivés azotés

La détermination du bilan azoté se fait sur le plasma et sur les urines de 24 heures, les principaux dérivés azotés urinaires étant l'urée, la créatinine et l'acide urique (Frey et al., 2001). Parce que le taux de filtration glomérulaire (TFG) est difficile à mesurer dans la pratique clinique, la plupart des cliniciens l'estiment à partir de la concentration sérique de la créatinine (Levey et al. 1999).

- La créatinine est un produit de dégradation de la créatine. Elle est filtrée au niveau glomérulaire mais n'est pas réabsorbée au niveau tubulaire. Elle est utilisée pour détecter l'apparition d'une insuffisance rénale, d'ajuster les doses de médicaments excrétés par les reins, et d'évaluer l'efficacité du traitement pour une maladie rénale progressive par le calcul de sa clearance (Levey et al. 1999).

- L'urée est la forme principale d'élimination des déchets azotés provenant du catabolisme des protéines et c'est le composé azoté le plus abondant de l'urine. Elle est complètement filtrée par le glomérule et réabsorbée partiellement au niveau du tubule rénal de façon inversement proportionnelle au débit urinaire.

- L'acide urique est le produit final du métabolisme des purines. Il est principalement éliminé par le rein : filtré par le glomérule rénal, ensuite réabsorbé au niveau du tube proximal, puis sécrété au niveau du tube distal (Frey et al., 2001).

III.4.1.2.2. Bilan potassique

Le potassium est le principal cation (plus de 90%) des liquides intra cellulaires. Sa réduction dans les excrétions rénales c'est-à-dire une hyperkaliémie ([K+] > 5 mmol/L) révèle une insuffisance rénale aigue ou chronique.

III.4.1.2.3. Bilan phosphocalcique

L'excrétion urinaire du calcium est l'aboutissement de mécanismes hormonaux et vitaminiques complexes de régulation du calcium endogène qui ont pour objet de maintenir la calcémie à un niveau constant (Brunette, 1997). Dans la majorité des pathologies, la calciurie ne constitue pas un élément diagnostique à lui seul mais c'est un point clé du diagnostic des lithiases et des tubulopathies (Frey et al., 2001).

III.4.1.2.4. Protéinurie

L'altération de l'intégrité de la barrière glomérulaire provoque la filtration de grosses molécules, normalement retenues, et se manifeste par une protéinurie (Marshall et Bangert, 2005). Cette dernière est une des plus fréquentes anomalies urinaires. Sa mise en évidence se fait très souvent à l'aide de bandelettes réactives. Une technique quantitative est alors nécessaire pour déterminer la concentration et le débit des protéines urinaires.

La perméabilité de la membrane de filtration aux protéines est influencée par leur taille, leur masse moléculaire, leur volume, leur charge électrique (Soto et Niaudet, 1997).

III.4.1.2.5. Enzymurie « γGT »

La détermination d'une enzymurie a été essentiellement utilisée pour le diagnostic précoce d'une insuffisance rénale aigue par toxicité médicamenteuse (Bagshow et Bellomo, 2007). La gamma glutamyle transférase est une glycoprotéine membranaire qui catalyse le transfert de résidus gamma-glutamyl du glutathion. Elle se trouve surtout dans le rein, dans le pancréas, la rate, l'intestin et en quantité moindre dans le coeur, le foie, le cerveau (Labescat, 2008). L'activation de la gamma-GT dans les urines peut être considérée comme le premier signe du début de la néphrotoxicité.

III.4.1.2.6. Cystatine C

Elle fait partie des marqueurs récemment étudiés et qui pourraient être une meilleure approche dans l'évaluation des altérations de la fonction rénale. La cystatine C est une protéine non glycosylée qui appartient à la famille des cystéines protéase. Elle est produite à un taux constant par les cellules nucléées, totalement filtrée par le rein. Elle est totalement réabsorbée

et catabolisée au niveau du tube contourné proximal. Son taux est indépendant de l'age, du sexe et de la masse musculaire. Elle est mesurée par immunonéphélométrie et son taux sanguin est corrélé à la filtration glomérulaire (Bagshow et Bellomo, 2007).

Matériel & Méthodes

I. Matériel

I.1. Partie galénique

Il est évident que suivant l'utilisation ultérieure des liposomes des types différents et donc des préparations différentes de liposomes doivent être préférentiellement utilisées. Ainsi, les diverses compositions lipidiques, la taille ainsi que la charge électrique des liposomes, peuvent influencer considérablement sur la distribution et l'élimination des liposomes *in vivo*. Il est possible de distinguer deux types majeurs de liposomes : les grands liposomes multi ou unilamellaires et les petits liposomes unilamellaires.

Les liposomes ont été décrits pour la première fois par Bangham et al. (1965). La méthode de préparation dite également méthode d'hydratation d'un film lipidique n'as pas changé et reste la plus simple des préparations de liposomes. Cette technique consiste à agiter mécaniquement la suspension aqueuse, contenant les solutés à encapsuler (doxorubicine), introduite sur le film lipidique séché par évaporation du solvant organique.

I.1.1. Préparation des liposomes

Les liposomes utilisés dans notre étude ont été préparés par Mr. Mohamed ALYANE sous la direction du professeur Gillian BARRATT dans le laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud (France).

La préparation a été réalisée selon la procédure suivante :

38.95mg de Lipo-HEPC, 32.411mg de lipo-HEPC/Chol et 37.432mg de lipo-EPC/Chol/PEG ont été dissout dans 2 à 3ml du chloroforme puis transvasé dans un ballon de 50ml. Une évaporation du solvant sous vide à l'évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R-215, Switzerland) à la température ambiante a permis d'obtenir un fin film lipidique sur les parois du ballon au fur et à mesure de cette évaporation.

Le film lipidique ainsi obtenu est réhydraté à 70°C (au dessus de la température de transition de phase), ceci est réalisé par l'addition de 10 ml de la solution de sulfate d'ammonium (250 mM, pH5.4, température 70°C) et de quelques billes en verre (pour faciliter le décollement du film lipidique). Une forte agitation au vortex pendant 5 min suivie d'une rotation à l'évaporateur rotatif à 70°C permet l'obtention d'une solution trouble, laiteuse et légèrement bleuté et indique la formation des liposomes.

A 70°C la solution des liposomes a subit une extrusion à l'aide d'un extruder sous pression d'azote pour avoir des liposomes de taille homogènes, à travers des membranes en polycarbonate (Whatman, Maidstone, Kent, UK) de 0.2µm ensuite de 0.1µm pendant 5 fois et 10 fois respectivement.

Les échantillons de liposomes sont conservés à 4°C et sous atmosphère inerte (azote) afin d'éviter leur oxydation avec l'oxygène de l'air.

Les liposomes ont ensuite été caractérisés par la mesure de leurs tailles et la détermination de leurs taux d'encapsulation. Cependant les propriétés électriques de surface des particules dispersées influencent également le comportement physique, chimique et biologique des liposomes.

I.1.2. Mesure de la taille

La taille des liposomes dispersés dans du sulfate d'ammonium pH 5.4 a été mesurée par spectroscopie en autocorrélation de la diffusion quasi-élastique d'un rayon laser monochromatique (Zetasizer Nano ZS Zen 3600, Malvern instruments Ltd, Malvern, UK) à 25 °C dans les conditions suivantes : viscosité de 0.8945 centipoise et indice de réfraction du dispersant 1.335.

Après la préparation des liposomes, la solution est prélevée et introduite dans une cuve qui par la suite a été insérée dans l'appareil pour mener les mesures.

I.1.3. Mesure du potentiel zêta

La pertinence de la mesure du potentiel zêta pour compléter la caractérisation de ces liposomes a été envisagée. L'analyse réalisée permet de situer l'intérêt du potentiel zêta dans trois domaines : la caractérisation des interactions potentielles entre la substance active et la forme vectorisée, l'estimation de la biodistribution du vecteur et l'évaluation de la stabilité physique et chimique de la dispersion. Le potentiel zéta des liposomes dispersés dans de l'eau milliQ (dilution 1/30) est mesuré aussi par spectroscopie à 25°C, après dilution au 50ème par l'eau milliQ et dans les conditions suivantes : viscosité de 0.8945 centipoise et indice de réfraction du dispersant 1.335. Chaque mesure a été réalisée 3 fois durant 1 minute.

I.1.4. Calcul du taux d'encapsulation

Pour la séparation de la fraction du principe actif non encapsulé (doxorubicine), La chromatographie sur gel de séphadex G-25 (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare Ltd, Sweden) a été utilisée.

La doxorubicine encapsulée est ensuite quantifiée par spectrophotométrie à 483 nm (Shimadzu UV-vis spectrophotometre, Japan) après lyse des liposomes avec du SDS 10% (w/v, eau melliQ).

I.2. Partie biologique

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire de pharmacologie du département de biologie à l'université de Jijel. Il est consacré à l'évaluation *in vivo* de la néphrotoxicité de la doxorubicine nue ou encapsulée dans les liposomes.

I.2.1. Entretien des animaux

L'étude a été réalisée sur des rats Wistar albinos femelles (Institut Pasteur d'Alger, Algérie) pesant environs de 160-180g. Les animaux sont répartis en quatre groupes de six chacun. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. La température de l'animalerie est maintenue à 22°C, hygrométrie de 60% et un cycle jour nuit de 12h-12h.

- ***Groupe 01 (06 rats) :*** Animaux témoins recevant **0,9 ml** de Nacl 0,9% par voie intraveineuse.
- ***Groupe 02 (06 rats) :*** Animaux recevant **1,1 ml** de liposomes vides à une dose unique de **10 mg/kg** par voie intraveineuse.
- ***Groupe 03 (06 rats) :*** Animaux recevant **1,2 ml** de doxorubicine liposomale pégylée à une dose unique de **10 mg/kg** par voie intraveineuse.
- ***Groupe 04 (06 rats) :*** Les animaux de ce groupe sont traités par la doxorubicine seule (**0,9 ml**) à une dose unique de **10 mg/kg** par voie intraveineuse.

I.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques

Les animaux sont placés en cage à diurèse pendant deux périodes consécutives de 24 heures après l'injection des médicaments et à la veille des jours des prélèvements sanguins dans un intervalle de temps régulier : 2, 7, 15 et 21 jours. Les urines sont récupérées pour la mesure de la créatininurie.

Le sang est prélevé sur tubes héparinés à l'aide d'un tube capillaire au niveau de l'œil (sinus rétro-orbital). Il est centrifugé à 3300 tours / minute pendant 10 minutes (Centrifugeuse 55702, Bioblock scientific, Italy) puis le plasma récupéré est utilisé pour les analyses biochimiques.

Pour l'étude tissulaire, les animaux sont sacrifiés, après anesthésie par l'éther, à un intervalle de temps réguliers de 2, 7, 15 et 21 jours après l'administration du médicament anticancéreux « doxorubicine » et « doxorubicine liposomale pégylée ». Ensuite, les reins sont prélevés, l'un est fixé dans le liquide de Dubosc Brazil pour l'examen histologique et l'autre est congelé à (- 20°C) pour réaliser les dosages tissulaires du stress (MDA, GSH, SOD, CAT et GST).

II. Méthodes

II.1. Dosages biochimiques

II.1.1. Dosage de la créatinine sérique et sa clairance

La créatinine provient du métabolisme de la créatine musculaire et la quantité quotidienne produite est relativement constante. La mesure de la créatinine dans le sang est le test à utiliser pour une évaluation de base de la fonction rénale.

La créatinine sérique est mesurée selon la méthode colorimétrique de Jaffe (Bonsnes et al., 1945) grâce à la formation d'un produit coloré en présence d'un picrate alcalin. La mesure est faite à l'aide d'un spectrophotomètre à 492 nm. La créatininémie est exprimées en µmole/L.

La clairance C d'une substance est le volume de plasma épuré de cette substance par unité de temps. Ainsi, lorsqu'une substance est librement filtrée et éliminée exclusivement par le rein, la clairance est égale au débit de filtration glomérulaire :

$P \times DFG = U \times V$ ou $DFG = U \times V / P$

Où

P est la concentration plasmatique d'une substance,

DFG : le débit de filtration glomérulaire,

U : la concentration urinaire de la substance étudiée

et V : le volume des urines (Bagshow et Bellomo, 2007).

Les limites de la dépendance de la production de créatinine par la musculature peuvent être contournées par le dosage de la quantité de créatinine effectivement excrétée, ce qui demande une collecte d'urine sur 24 heures. La quantité totale de créatinine dosée peut être mise en relation avec la concentration sérique et le temps, ce qui donne le volume de sang épuré de créatinine par unité de temps:

$$\text{Clairance de la créatinine [ml/min]} = \frac{\text{Créatinurie [µmol/L] x volume urinaire [ml]}}{\text{Créatininémie [µmol/L] x durée de collecte [min]}}$$

II.1.2. Dosage des triglycérides plasmatiques

La mesure des triglycérides est importante dans le diagnostic et la gestion des hyperlipidémies. Nous avons dosé le taux de triglycéridémie automatiquement par l'automate (PHD Diam's 2300 +, analyseur de biochimie, European union) à l'aide d'un kit Biolabo. Les résultats sont exprimés en mg /l.

II.1.3. Contrôle urinaire

Pour le contrôle urinaire des rats traités par la doxorubicine 10 mg/ kg, la doxorubicine liposomale pégylée 10 mg/kg et les liposomes vides 10 mg/kg, nous avons utilisé des bandelettes Multistix qui apportent quelques informations supplémentaires d'intérêt : la présence ou non de bilirubine, d'urobilinogène, de cétone, de glucose, de protéines, du sang, de nitrite et de leucocytes et qui donne encore la valeur de la densité et du pH urinaire.

II.2. Dosages tissulaires

Les dosages de MDA, de GSH et des enzymes antioxydantes : SOD, CAT et GST sont effectués sur des fragments de rein au délai de 2, 7, 15 et 21 jours après le traitement par la doxorubicine nue et encapsulée.

II.2.1. Dosage de Malondialdehyde (MDA) cytosolique

Le malondialdehyde (MDA) est un index de la peroxydation lipidique globale. La méthode est basée sur la détection spectrophotomètrique du complexe MDA - acide thiobarbiturique (MDA - TBA). La méthode d'Okhawa et al., (1979) est utilisée pour ce dosage.

Le principe de dosage est le suivant : le MDA réagit avec deux molécules de TBA (Acide Thiobarbiturique) dans un milieu acide (pH 2 à 5) et à chaud (100°C) pour donner un pigment coloré en rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

Pour ce dosage, nous avons utilisé 1g de rein additionné à 3 ml de la solution de Kcl (1.15M) puis broyage par un homogénéiseur de DOUNCE (KONTES, Glass company an ISO-9001 steered firm. New Jersey USA). A 0.5 ml de l'homogénat nous avons additionné 0.5ml d'acide trichloracétique à 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.67%. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours /minute (Centrifugeuse 55702, Bioblock scientific, Italy), la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530 nm (UV mini 1240, Shimadzu corporation, Japon).

Les concentrations du MDA sont déduites à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant le tetraethoxypropane (son hydrolyse donne le MDA). Les résultats sont exprimés en nM/ mg de protéines.

II.2.2. Dosage du glutathion (GSH) cytosolique

Le glutathion constitue la principale source de thiol dans la cellule et se trouve sous deux formes : une forme oxydée « GSSG » et une forme réduite « GSH » représentant plus de 99% de la quantité totale (Virot, 2004).

Pour le dosage de GSH, nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'Ellman (1959) par le réactif DTNB (acide 5-5- dithiobis 2-nitrobenzoique). Le principe de la réaction consiste en l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide thionitrobenzoique (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :

Pour cela 1g de rein est homogénéisé avec 3 volumes de l'acide trichloracétique (TCA 5%) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. Homogénéisé et centrifugé à 2000 tours/ minute pendant 15 minutes, ensuite 50 µl du surnageant sont diluées dans 10 ml de tampon phosphate (Na_2HPO_4 0.1M, pH =8). 20 µl du DTNB (0.01M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 15 minutes d'incubation, la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%).

Le taux de GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparé dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations de glutathion sont exprimées en mM / ml.

II.2.3. Préparation de la fraction cytosolique

Pour la préparation de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par Iqbal et al. (2003). Pour cela, 0,5 g de rein sont coupés et homogénéisés avec 3 volumes de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) contenant du KCl à 1,17% à l'aide d'un broyeur de DOUNCE.

L'homogénat est d'abord centrifugé à 2000 tours/min pendant 15 minutes à 4°C pour séparer les débris nucléaires ensuite à 9600 tours/min, pendant 30 minutes. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé comme source enzymatique.

II.2.3.1. Mesure de l'activité superoxyde dismutase (SOD) cytosolique

L'activité enzymatique de la SOD est déterminée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). Cette activité enzymatique dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitroblue-tetrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électrons comme la méthionine selon la réaction suivante :

$$\text{Riboflavine} + O2 \xrightarrow{\text{Photoréaction}} \text{Superoxyde}$$

$$\text{Super oxyde} + \text{NBT} \longrightarrow \text{Formazan}$$

Le mélange réactionnel contient 2 ml du milieu réactionnel (cyanide de sodium 10^{-2} M, solution du NBT $1{,}76\times 10^{-4}$ M, EDTA 66×10^{-3} M et la riboflavine 2×10^{-6} M), 5µl de la source enzymatique (cytosol) et 100 µl de la méthionine. Le mélange est irradié avec une lampe de 15 Watt pendant 10 mn. La réduction du NBT par l'anion superoxyde en Formazan a été suivie à 560 nm.

Une unité d'activité de la SOD est définie comme la quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT par 50%.

% d'inhibition = [(abs du control – abs de l'essai)/ abs du control] × 100

SOD UI/ml = % d'inhibition × 6,35

Le contrôle est préparé dans les mêmes conditions mais sans source enzymatique. Les valeurs sont exprimées en UI/ml.

II.2.3.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode de Claiborne, 1985. Le principe est basé sur la disparition de l'H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 25° C. Ainsi, la cuve de mesure contient 1 ml de tampon phosphate (KH_2PO_4 0.1M, pH 7.2), 0.950 ml peroxyde d'hydrogène (0.019M) et 0.025 ml de la source enzymatique. La lecture de la DO est effectuée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'activité enzymatique est exprimée en UI/g de protéine selon la relation suivante :

UI/g de protéine = (2,3033/T. log A1/A2) /g protéines.

Sachant que:

A1: Absorbance au temps 0 mn.

A2: Absorbance après 1 mn.

T : Intervalle de temps en mn.

II.2.3.3. Mesure de l'activité enzymatique du glutathion S- transférase (GST) cytosolique

L'activité enzymatique de la GST est déterminée selon la méthode de Habig et al., (1974). Cette activité enzymatique est étudiée en cinétique. Le substrat utilisé est le chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB) préparé dans l'éthanol 95°. L'enzyme a besoin d'un second substrat pour être active, additionné sous forme de glutathion. L'enzyme permet le transfert du glutathion riche en électron ($GSH = GS^- + H^+$) sur le CDNB chargé positivement par gain d'un proton : attaque électrophile.

La mesure de l'activité enzymatique est effectuée au spectrophotomètre à 340 nm et à 25°C. Dans la cuve de mesure, nous avons introduit 1.7 ml du tampon phosphate (KH_2PO_4 0.1 M, pH = 6.5), 100 µl de CDNB (20 mM), après 10 minutes d'incubation à 37°C, 100 µl de glutathion (20 mM) et 100 µl de l'homogénat (cytosol) sont ajoutés à la cuve de mesure. L'absorbance est suivie pendant 5 minutes à 340 nm. Les activités glutathion S-transférase sont exprimées en UI / ml.

II.3. Etude histologique

Au moment du sacrifice des animaux, les reins sont prélevés et excisés en petites pièces et immédiatement fixés dans du Dubosc Brazil (mélange picro-formolé) pour permettre la conservation morphologique des structures tissulaires et cellulaires.

Pour la préparation des coupes histologiques, les biopsies rénales sont préalablement enrobées par passage de chaque prélèvement dans une série de bains d'alcools de concentrations croissantes (Shander Citadel 2000, Thermo scientific, Germany) qui déshydratent et dissolvent les graisses figurées intra-tissulaires ensuite de permettre l'imprégnation de la paraffine dans le tissu. L'imprégnation a été effectuée grâce à un distributeur automatique de paraffine (Shandon Histocenter 3, Thermo electron corporation, Germany). La coupe du bloc de paraffine au microtome (Leica, RM 2125 RT) nous a permis de réaliser des coupes très fines de 2 microns d'épaisseur. Les coupes ainsi obtenus sont déposées et collées sur des lames en verre.

Enfin, les coupes histologiques ont été déparaffinées au xylène et réhydratées dans des bains d'alcools de concentrations décroissantes. Pour permettre la mise en évidence des différentes structures tissulaires et cellulaires, les coupes obtenues ont été colorées par l'hématoxyline / éosine (HE) (Shandon Varistain 24-4, Thermo electron corporation, Germany) ; technique de coloration usuelle associant un colorant nucléaire (hématoxyline) et un colorant cytoplasmique (éosine).

L'examen au microscope optique permettant l'évaluation des changements pathologiques tissulaires du rein a été réalisée après montage de la préparation sous lamelle.

II.4. Analyse statistique

Les résultats graphiques sont présentés sous forme de moyenne et d'écart-type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par la doxorubicine seule à celles des groupes témoins d'une part, et d'autre part à celles traités par la doxorubicine liposomale pégylée et les liposomes vides en utilisant le test T de Student :

- ✓ $P > 0:05$: la différence n'est pas significative (ns).
- ✓ $P < 0.05$: la différence est significative (*).
- ✓ $P < 0.01$: la différence est très significative (**).
- ✓ $P < 0.001$: la différence est hautement significative (***).

Résultats & interprétation

I. 1. Evolution des taux de créatinine plasmatique

Les concentrations de créatinine sérique des animaux ayant reçus les différents traitements sont rassemblés dans les figures 11a et 11b. Chez les rats traités par la doxorubicine 10mg/ kg seule, on note une augmentation importante de la créatinine plasmatique. 48 heures après l'injection du médicament la concentration de la créatinine atteint 74.82 ± 0.24 µmole/l chez les rats traités contre 53.48± 0.622 µmole/l chez les témoins et atteint un maximum de 100.4 ± 0.82 µmole/l après 15 jours. Cependant, et au même délai de 15 jours, l'encapsulation de la doxorubicine dans les liposomes pégylée montre une réduction hautement significative ($p < 0,001$) de la créatininémie (60.62 ± 1.13 µmole/l). Ceci montre que l'encapsulation liposomale réduit la néphrotoxicité de la doxorubicine.

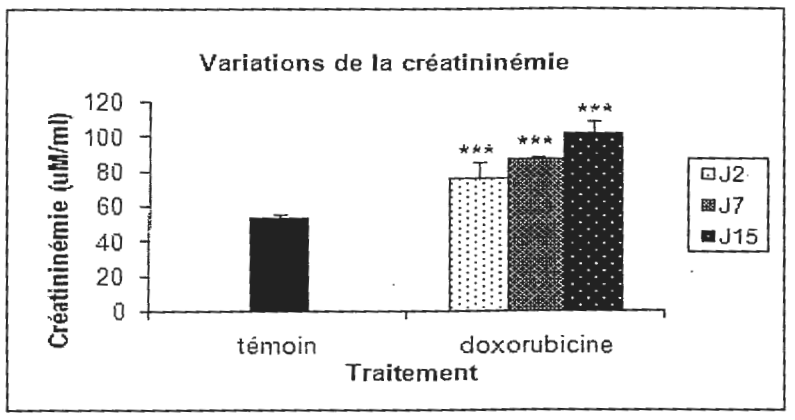


Figure 10a: Variations des taux de la créatinine sérique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg.

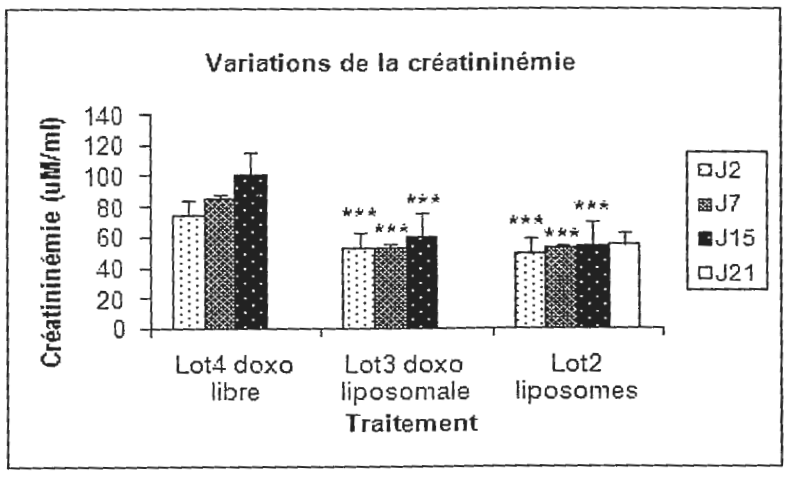


Figure 10b : Variations des taux de la créatinine sérique de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg, les liposomes vides 10 mg/kg et par la doxorubicine liposomale pégylée 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3). Test de Student : (ns) désigne un effet son significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

I.2. Effet de la doxorubicine sur la clairance de la créatinine

La figure 12a montre une diminution très significative ($p < 0,01$) de la clairance de la créatinine chez les animaux recevant la doxorubicine seule. Elle est observée dès le 2ème jour de traitement. Elle passe de 0,64 ± 0,15 ml/min à 0,168± 0,04 ml/min au 15 ème jour traduisant la diminution de la filtration glomérulaire. Toutefois, comme montre la figure 12b, l'augmentation de la clairance est très significative ($p < 0,01$) dans le groupe de rats traités par les liposomes vides et par la doxorubicine liposomale pégylée, elle atteint respectivement, 0,56 ± 0,09 ml/min et 0,55 ± 0,07 ml/min chez les deux groupes contre 0,168 ml/min chez les animaux traités par le médicament seul au délai de 15 jours.

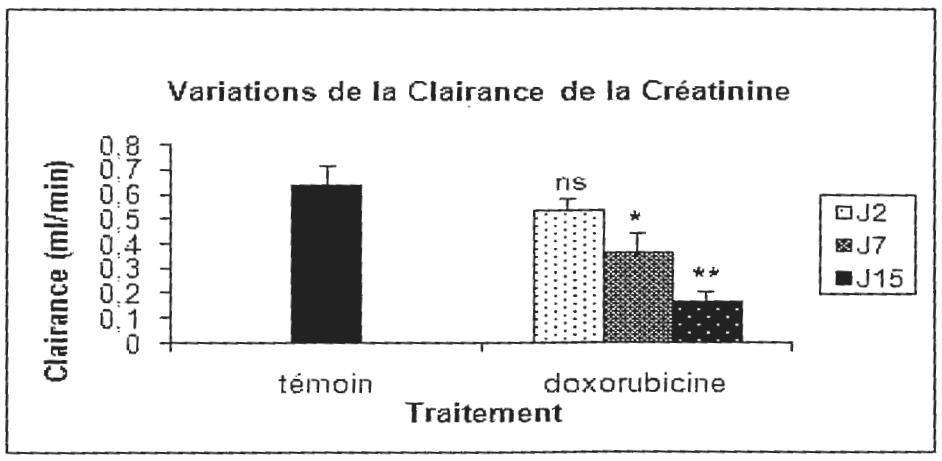


Figure 11a : Variations des taux de la clairance de la créatinine de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg.

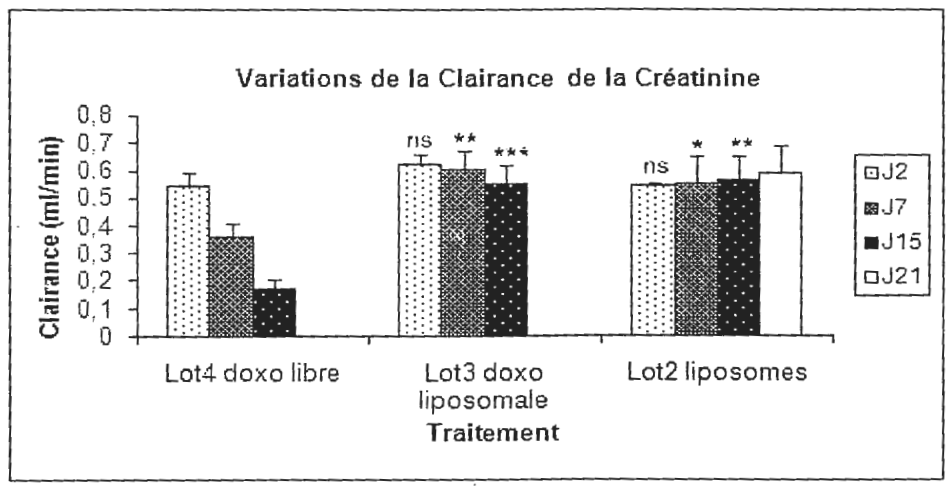


Figure 11b : Variations des taux de la clairance de la créatinine de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg, les liposomes vides 10 mg/kg et par la doxorubicine liposomale pégylée 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3). Test de Student : (ns) désigne un effet son significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

I.3. Evaluation des taux de triglycéride sérique

Administrée à une dose unique de 10 mg/ kg, la doxorubicine seule entraine une nette augmentation ($p < 0,001$) du taux de triglycérides sériques (figure 13a). Elle atteint 0.322 ± 0.012 mg/l contre 0.171 ± 0.004 mg/l chez les rats témoins au délai de 7 jours, cette élévation de la concentration de triglycérides est maximale au 15 ème jour après le traitement (0.341 ± 0.013 mg/l).

Les formulations liposomales à une dose unique de 10 mg/ kg atténuent la triglycéridémie par rapport au groupe recevant la doxorubicine seule (0.280 ± 0.013 mg/l chez les rats traités par la doxorubicine liposomale pégylée contre 0.341 ± 0.013 mg/l chez les rats recevant le médicament seul au délai de 15 jours) (figure 13b).

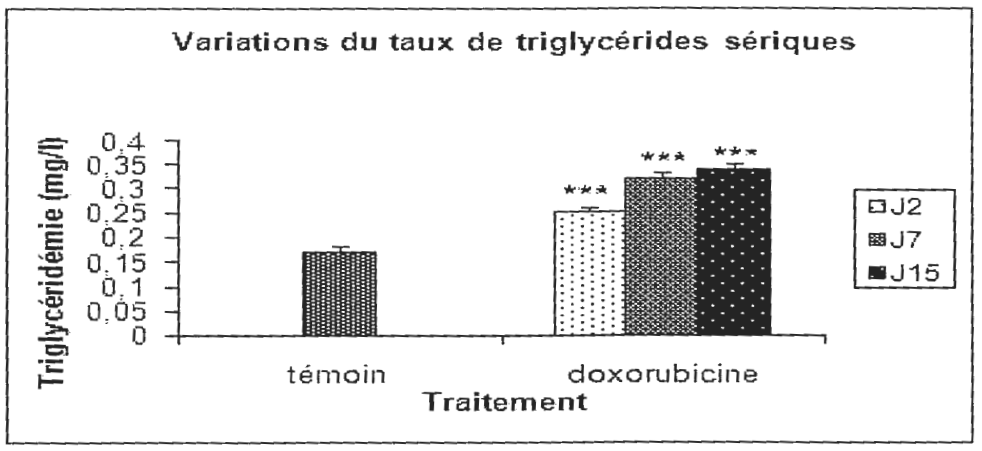


Figure 12a : Variations des taux de triglycérides sériques de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg.

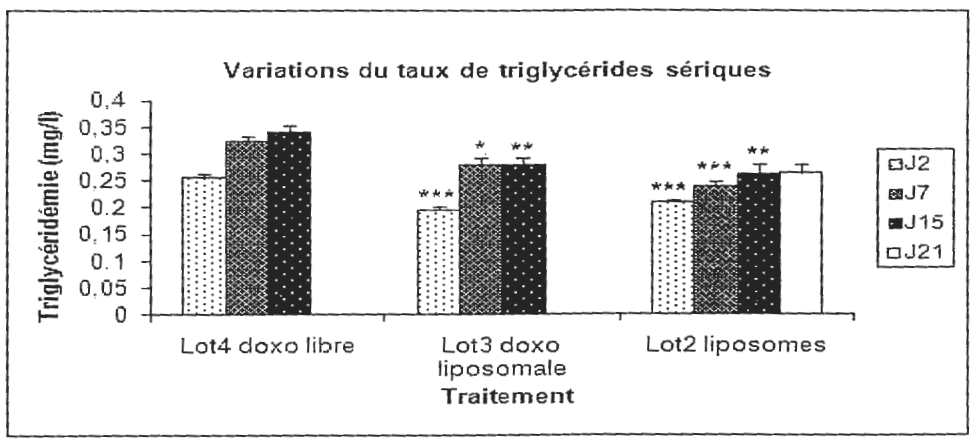


Figure 12b : Variations des taux de triglycérides sériques de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg, les liposomes vides 10 mg/kg et par la doxorubicine liposomale pégylée 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3). Test de Student : (ns) désigne un effet son significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

I.4. Variations des concentrations en malondialdehyde (MDA) du tissu rénal

Les variations des taux de malondialdehyde du tissu rénal après traitement par la doxorubicine seule 10 mg/ kg et sous forme liposomale 10 mg/kg ainsi pour les liposomes vides administrés à une dose de 10 mg/kg sont rapportés dans les figures 14a et 14b. Nous constatons chez les rats traités par la doxorubicine seule, une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) des taux du MDA en fonction du temps par rapport au témoin. Cette concentration atteint 71,9 ± 1,41 nM/mg de protéines contre 35,93 ± 0,092 nM/mg de protéines chez les témoins au délai de 15 jours. L'augmentation est beaucoup moins prononcée dans les lots de rats traités par les liposomes et la doxorubicine liposomale pégylée (46,77 ± 0,94 nM/mg de protéines pour les liposomes vides contre 71,9 ± 1,41 nM/mg de protéines pour la doxorubicine seule et 45,5 ± 0,63 nM/mg pour la doxorubicine liposomale au 15 ème jour).

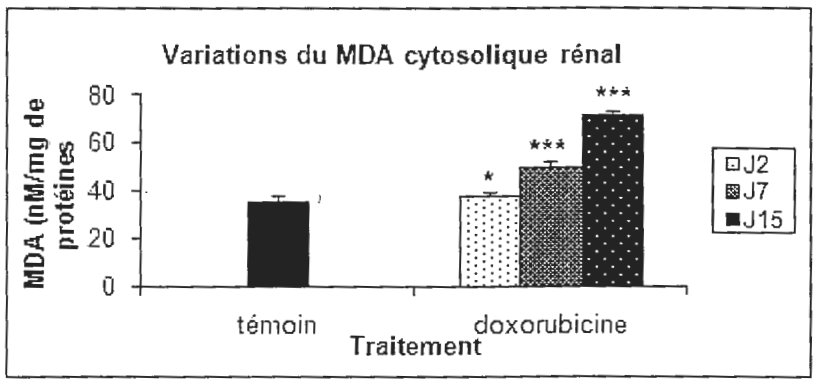


Figure 13a : Variations des taux du MDA cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg.

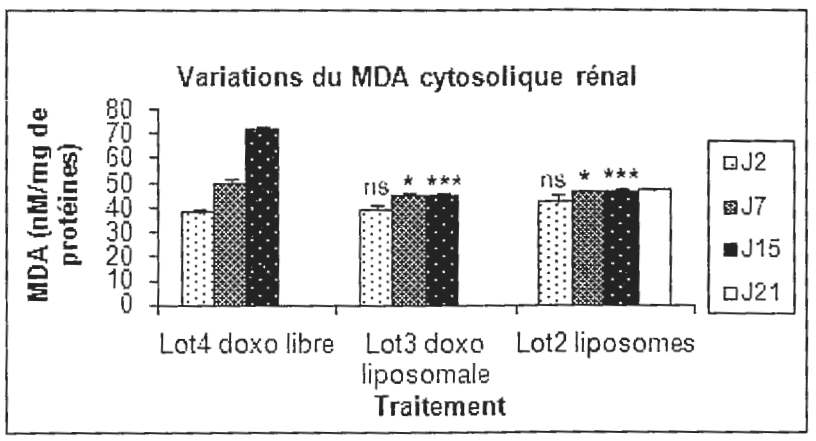


Figure 13b : Variations des taux du MDA cytosolique de rats traités par la doxorubicine 10mg/kg, les liposomes vides 10 mg/kg et par la doxorubicine liposomale pégylée 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3). Test de Student : (ns) désigne un effet son significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p< 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

I.5. Effet de la doxorubicine sur la réserve rénale en glutathion (GSH)

Les rats traités par la doxorubicine montrent une diminution de la concentration rénale en GSH (figure 15a). Cette diminution est hautement significative ($p < 0,001$) au 15ème jour du traitement (0,85 ± 0,14 Mm/ml contre 2 ,41 ± 0,014 Mm/ml chez les témoins).

Par contre, comme présente la figure 15b, on assiste à une augmentation très significative ($p < 0,01$) chez les rats traités par la doxorubicine liposomale pégylée et une modification hautement significative chez le groupe des liposomes vides (2,1 ± 0,01 mM/ ml et 2,62 ± 0,17 mM/ml pour la doxorubicine liposomale et les liposomes vides respectivement au délai de 15 jours contre 0,85 ± 0,14 mM/ml chez le groupe de rats recevant la doxorubicine seule).

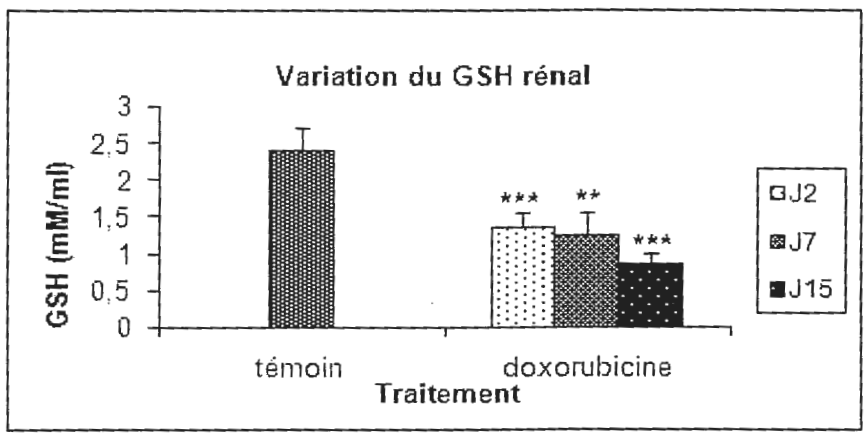


Figure 14a : Variations des taux du GSH cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg.

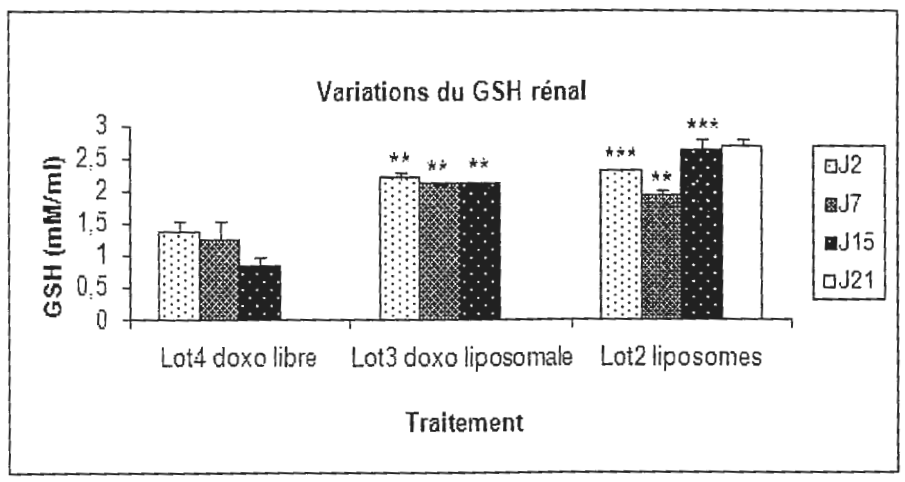


Figure 14b : Variations des taux du GSH cytosolique de rats traités par la doxorubicine 10mg/kg, les liposomes vides 10 mg/kg et par la doxorubicine liposomale pégylée 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3). Test de Student : (ns) désigne un effet son significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

I.6. Variations de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) cytosolique

L'activité superoxyde dismutase cytosolique des animaux traités par la doxorubicine seule 10 mg/ kg diminue de façon hautement significative ($p < 0,001$) et temps dépendante entre le 7ème jour (257,29 ± 7,36 UI/ ml contre 338,70± 12,3 UI/ml chez les témoins) et le 15ème jour (220,9 ± 3,06 UI/ ml) (figure 16a).

La figure 16b montre que les liposomes vides et la doxorubicine encapsulée modifient largement et de façon hautement significative cette activité (338 ± 2,88 UI/ ml contre 220,9 ± 3,06 UI/ ml dans le lot de doxorubicine libre au délai de 15 jours).

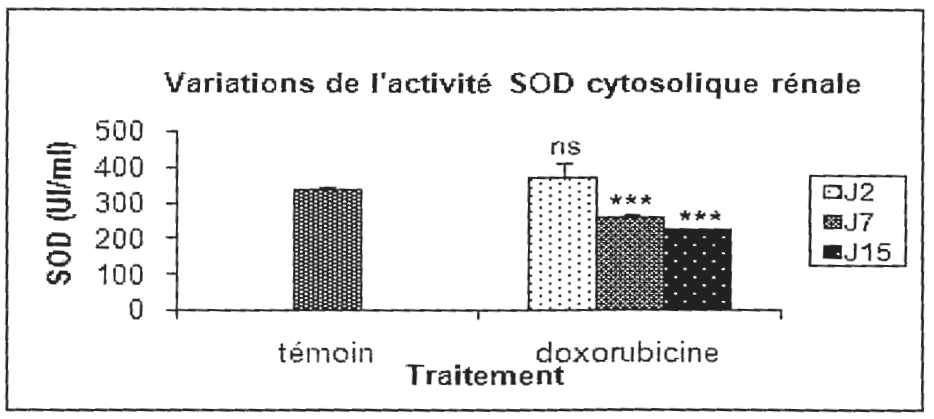


Figure 15a : Variations des taux de la SOD cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg.

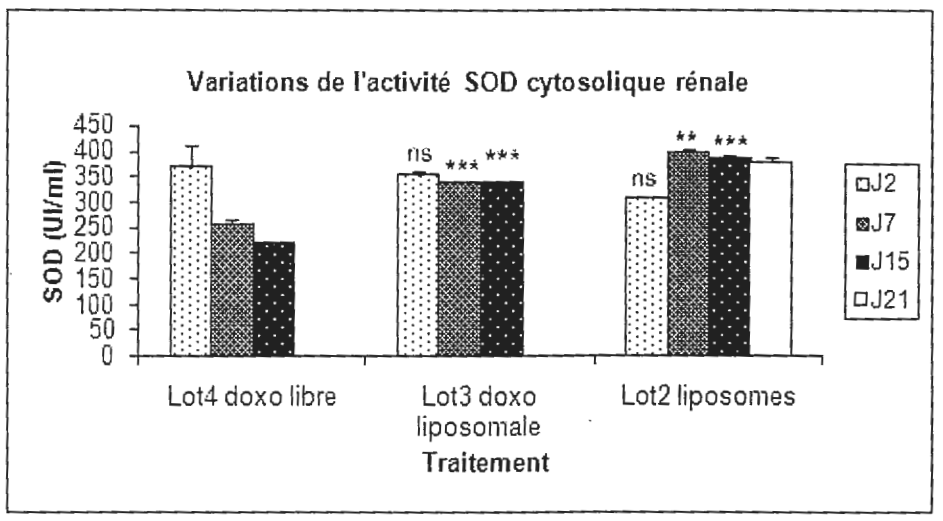


Figure 15b : Variations des taux de la SOD cytosolique de rats traités par la doxorubicine 10mg/kg, les liposomes vides 10 mg/kg et par la doxorubicine liposomale pégylée 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3). Test de Student : (ns) désigne un effet son significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

I.7. Evolution de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique

Le traitement des rats par la doxorubicine 10 mg /kg diminue l'activité catalase entre le 2ème et le 15ème jour de traitement. Cette activité reste diminuée par rapport à celle des témoins (0,159 ± 0,012 UI/g de protéines chez les rats traités contre la valeur du témoin 0,37 ± 0,02 UI/g de protéines) jusqu'au 15ème jour, tel qu'il est montré dans la figure 17a.

Le traitement par les liposomes vide n'influence pas l'activité catalasique du tissu ($p > 0,05$) atteint 0,28 ± 0,09 UI/g de protéines contre 0,159 ± 0,012 UI/g de protéines chez les traités par la doxorubicine au 15ème jour. Au même délai, on note chez les traités par la doxorubicine encapsulée une augmentation significative ($p < 0,05$) atteint 0,34± 0,085 UI/g de protéines contre 0,159 ± 0,012 UI/g de protéines chez les traités par la doxorubicine (figure 17b).

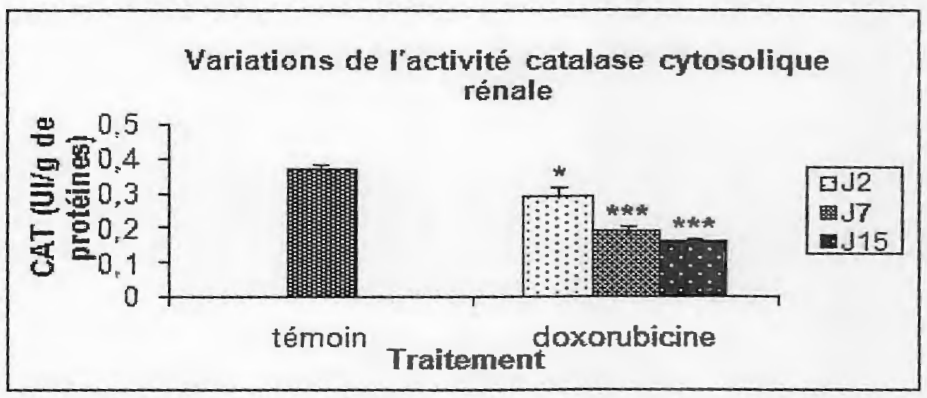


Figure 16a : Variations des taux de la CAT cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg.

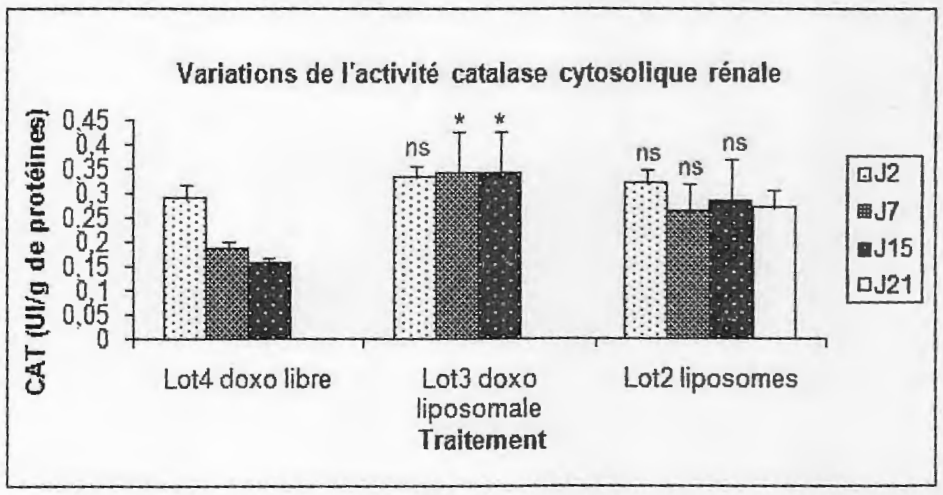


Figure 16b : Variations des taux de la CAT cytosolique de rats traités par la doxorubicine 10mg/kg, les liposomes vides 10 mg/kg et par la doxorubicine liposomale pégylée 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3). Test de Student : (ns) désigne un effet son significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

I.8. Evolution de l'activité enzymatique de la glutathion S transférase (GST) cytosolique

Comme le montre les figures 18a et 18b, la doxorubicine entraine une nette diminution de l'activité enzymatique de la GST cytosolique et ce dès le 2ème jour du traitement et qu'elle se maintient jusqu'au 15ème (125,75 ± 1,06 UI/ml contre 163,17 ± 1,66 UI/ml chez les témoins). Par contre, les deux formulations liposomales entrainent une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité GST qui atteint 166,42 ± 1,13 UI/ml contre 125,75 ± 1,06 UI/ml chez le groupe traité par la doxorubicine libre.

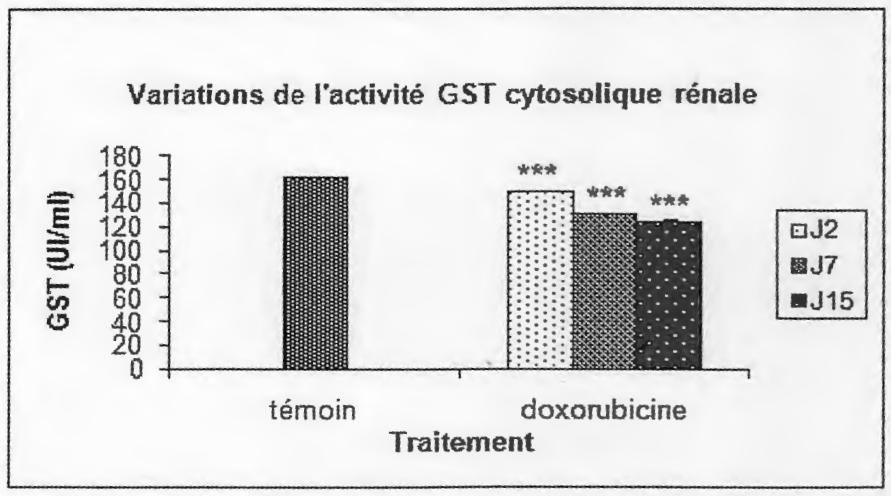


Figure 17a : Variations des taux de la GST cytosolique de rats témoins et de rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg.

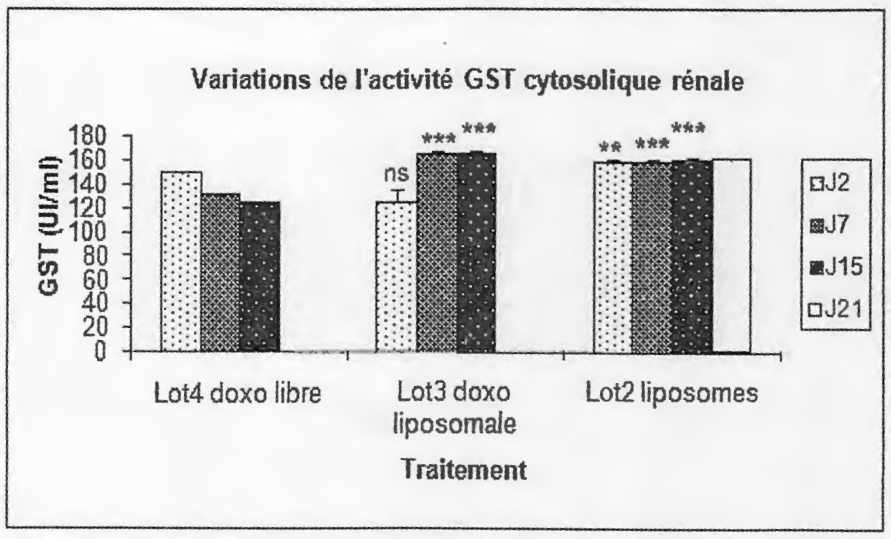


Figure 17b : Variations des taux de la GST cytosolique de rats traités par la doxorubicine 10mg/kg, les liposomes vides 10 mg/kg et par la doxorubicine liposomale pégylée 10 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=3). Test de Student : (ns) désigne un effet son significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

I.9. Evaluation de l'effet de la doxorubicine nue et encapsulée sur la fonction rénale

Administrée à une dose unique de 10 mg/kg et après 15 jours, la doxorubicine liposomale pégylée entraine une diminution hautement significative du taux de MDA et une augmentation très significative du taux de GSH du tissu rénal. Concernant les enzymes de défense cellulaire, le statu antioxydant rénal augmente de façon hautement significative pour la SOD et GST et de façon significative pour la CAT par rapport à la doxorubicine nue (figure 19a).

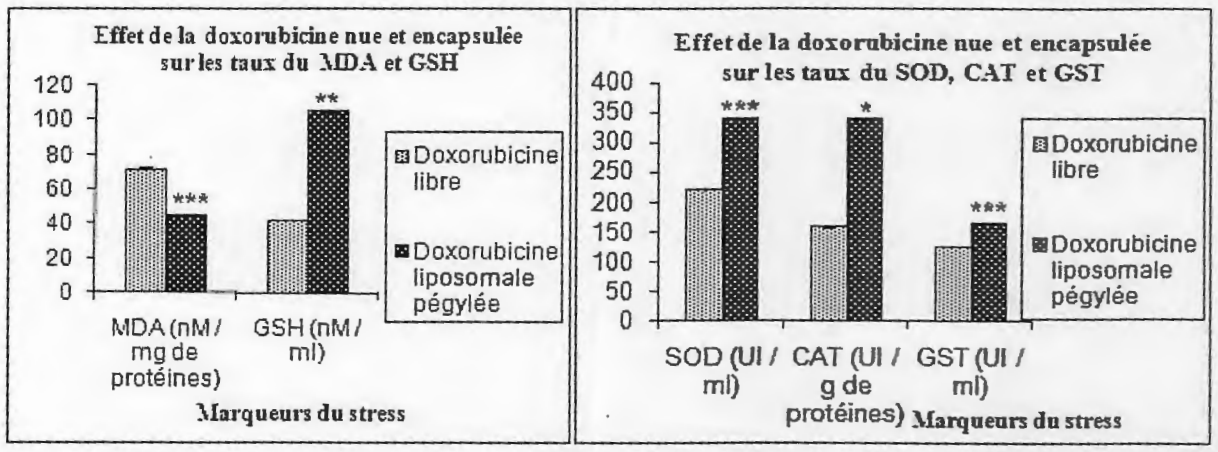


Figure 18a : Effet de la doxorubicine nue et encapsulée sur les capacités de défense antioxydante enzymatique SOD, CAT (×100), GST et non enzymatique GSH (×50) et sur les taux du MDA au délai de 15 jours.

Au délai de 15 jours, la figure 19b montre, chez les rats recevant la doxorubicine encapsulée, une diminution hautement significative des taux de la créatininémie et une augmentation hautement significative de la clairance de la créatinine par rapport à ceux traités par la doxorubicine nue.

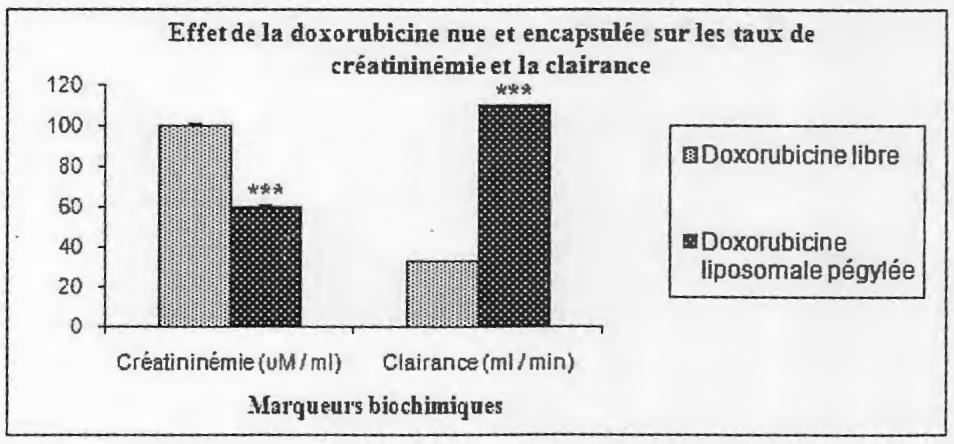


Figure 18b : Effet de la doxorubicine nue et encapsulée sur les marqueurs biochimiques rénaux la créatinine sérique et sa clairance (×200) au délai de 15 jours.

I.10. Résultats d'analyse des urines à l'aide de bandelettes réactives

Les résultats des contrôles urinaires réalisés en moyen des bandelettes Multistix sont résumés dans le tableau suivant :
Bilir (bilirubine) ; urob (urobilinogène) ; céto (cétones) ; gluc (glucose) ; prot (protéines) ; nitri (nitrites) ; D (densité) ; leuco (leucocytes) ; norm (normale) ; neg (négatif).

Jours	*lots*	*bilir*	*urob*	*céto*	*Gluc*	*Prot*	*sang*	*Nitri*	*pH*	*D*	*Leuco*
J2	*Lot1*	neg	norm	neg	norm	30	neg	Neg	6	1.025	neg
	Lot2	+	norm	neg	norm	100	+ca.5-10	Neg	7	1.010	neg
	Lot3	neg	norm	neg	norm	100	+ca.5-10	Neg	5	1.030	neg
	Lot4	neg	norm	neg	norm	neg	+ca.5-10	neg	8	1.015	neg
J7	*Lot1*	neg	norm	neg	norm	30	+ca.5-10	neg	6	1.030	neg
	Lot2	+	norm	neg	norm	30	+ca.5-10	neg	8	1.005	neg
	Lot3	neg	norm	neg	norm	30	+ca.5-10	neg	7	1.015	neg
	Lot4	neg	norm	neg	norm	30	+ca.5-10	neg	8	1.020	neg
J15	*Lot1*	+	neg	norm	neg	500	+ca.5-10	neg	7-8	1.015	neg
	Lot2	neg	norm	neg	norm	30	+ca.5-10	+	8	1.010	neg
	Lot3	+	norm	neg	norm	100	neg	neg	8	1.010	neg
	Lot4	neg	norm	neg	norm	30	+ca.5-10	neg	6	1.025	neg
J21	*Lot1*	neg	norm	neg	norm	30	neg	neg	9	1.000	neg
	Lot2	neg	norm	neg	norm	30	++ca.5-10	neg	8	1.005	neg
	Lot4	neg	norm	neg	50	30	++ca.5-10	neg	6	1.015	neg

I.11. Examen histopathologique du tissu rénal

❖ Microscopie optique des reins des rats contrôle

L'évaluation en microscope optique des reins des animaux témoins a montré une architecture normale du parenchyme rénale avec une conservation nette des glomérules et des tubules rénaux, l'examen des tubules contournés proximaux présente une morphologie bien attachée avec une bordure en brosse intacte (figure 20).

(A) (B)

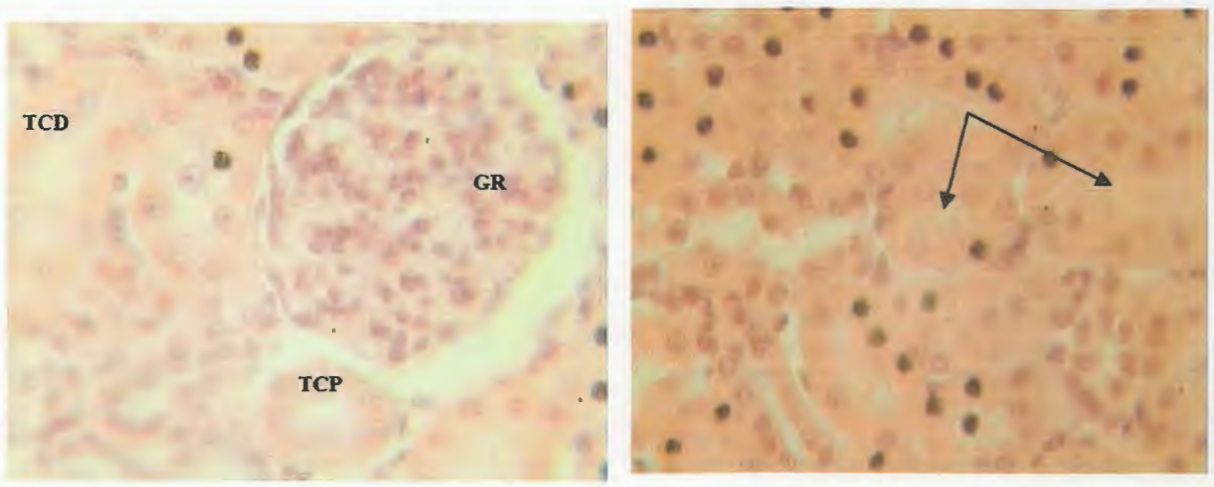


Figure 19 : Photomicrographie de l'examen histopathologique des reins contrôles (hématoxyline & éosine × 40). (A) GR : glomérule rénale, TCP : tube contourné proximale, TCD : tube contourné distale. (B) bordure en brosse intacte (flèches).

❖ Microscopie optique des reins des rats traités par la doxorubicine

Par comparaison à la figure précédente, la microscopie optique des sections rénales après le traitement par la doxorubicine a révélé des altérations morphologiques évidentes, qui comprennent la désorganisation du parenchyme rénale caractérisée par une atrophie et une rétraction ischémique glomérulaire importante, illustrées par une perte du volume glomérulaire et un très large espace de Bowman. Alors que les profils tubulaires exposent des changements atrophiques caractérisés par la perte de la bordure en brosse, l'atténuation du cytoplasme des cellules épithéliales, des nécroses de l'espace focale et tubulaire et des dépôts protéiques importants. La présence de plusieurs cellules inflammatoires dans le secteur rénale, marquée par une infiltration des mononucléaires, a été observée (figure 21).

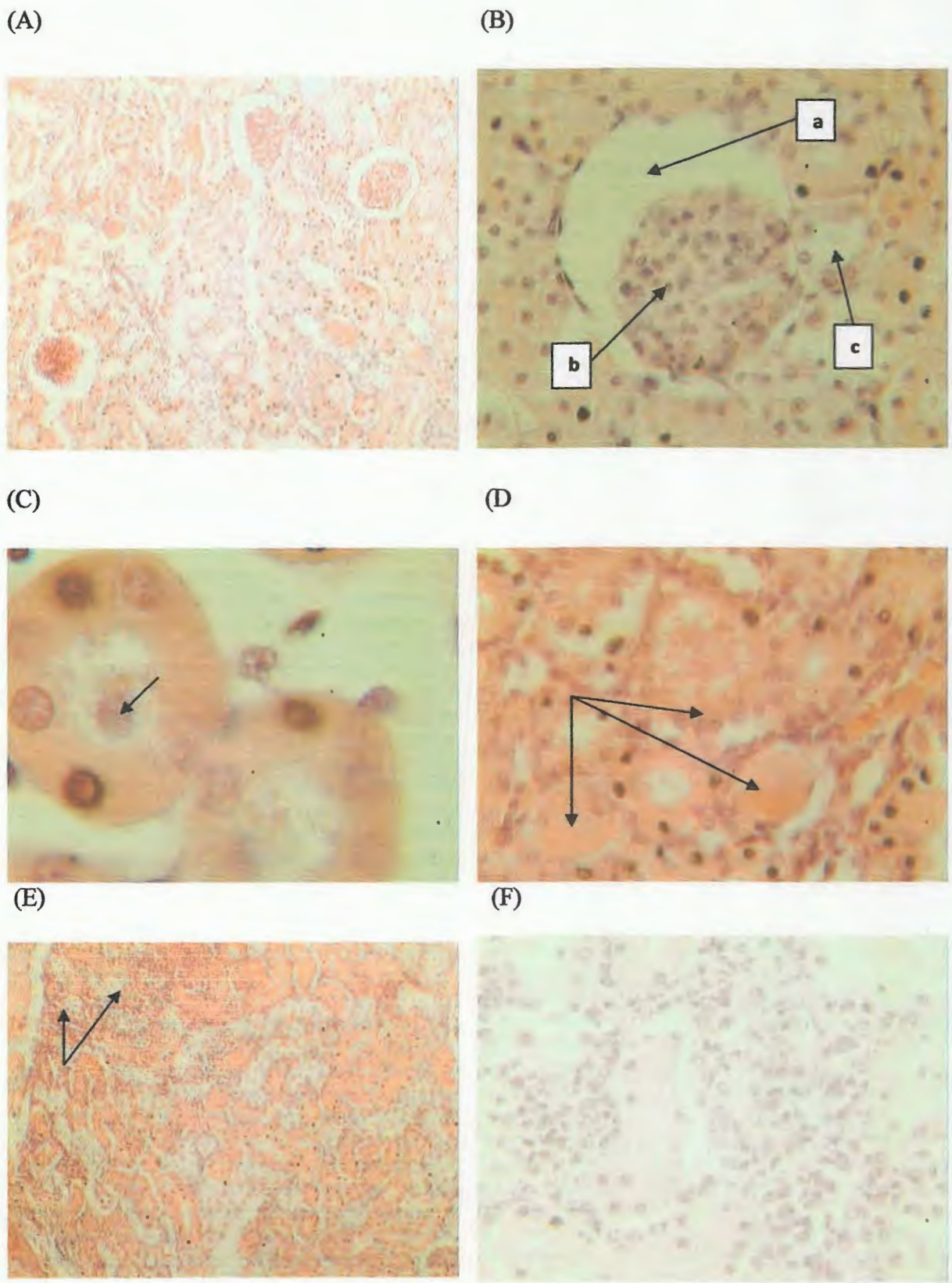


Figure 20 : Photomicrographie de l'examen histopathologique des reins de rats traités par la doxorubicine nue (hématoxyline & éosine). (A) désorganisation du parenchyme (×10), (B) a→ large espace de Bowman, b→ rétraction glomérulaire, c→ perte de la bordure en brosse (×40), (C) cellule en voie de nécrose dans la lumière tubulaire (flèche) (×100), (D) dépôts protéiques dans les TCD (flèches) (×40), (E) plage de neutrophiles (flèches) (×10), (F) phénomène d'infiltration (×10).

❖ **Microscopie optique des reins des rats traités par la doxorubicine liposomale pégylée et les liposomes vides**

Les résultats histologiques obtenus, et qui sont représentés dans les figures 22 et 23, ont montré que le traitement par la doxorubicine liposomale pégylée et les liposomes vides réduit de façon significative les lésions glomérulaires et tubulaires induites par la doxorubicine nue.

La morphologie a été trouvé similaire à celle du contrôle signifie que les formulations liposomes n'avait aucune influence sur la structure rénale.

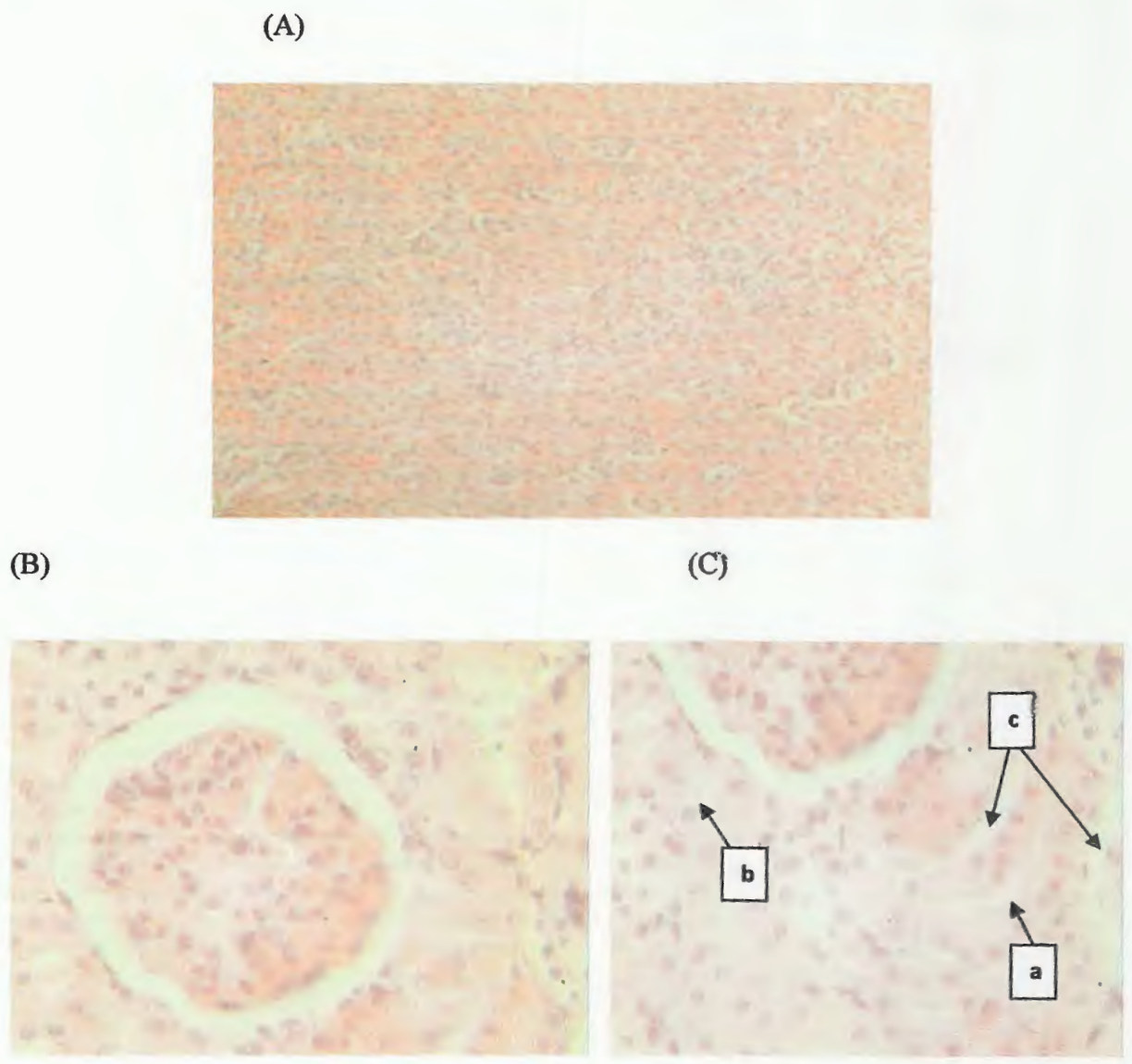
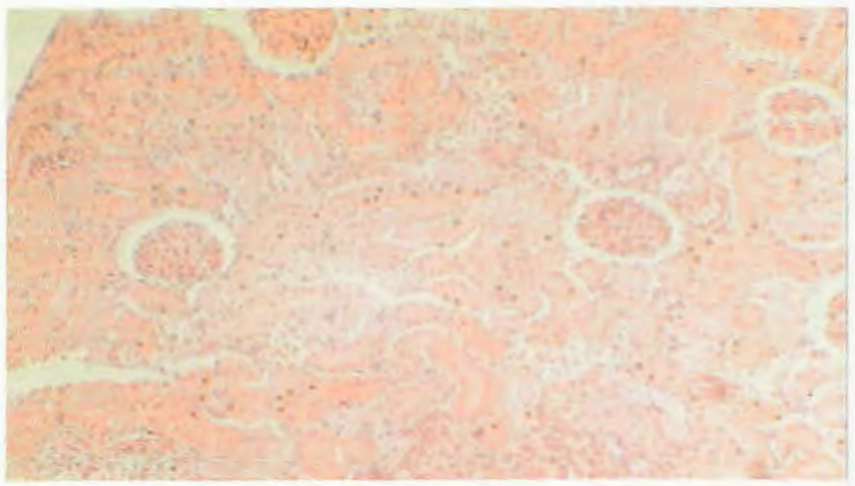
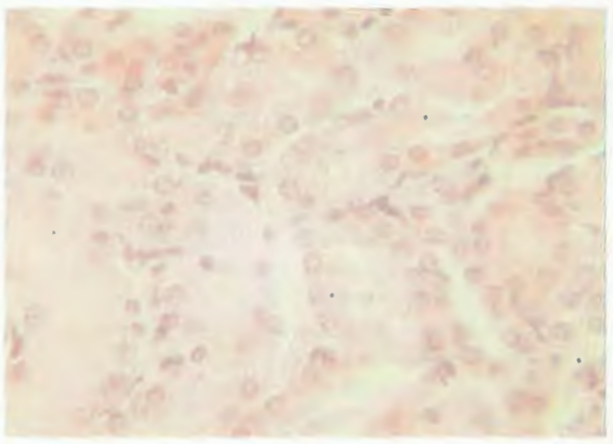


Figure 21 : Photomicrographie de l'examen histopathologique des reins de rats traités par les liposomes vides (hématoxyline & éosine). (A) vue d'ensemble du parenchyme rénal (×4), (B) corpuscule rénale intacte avec glomérule et espace de Bowman conservés (×40), (C) a→ tube contourné distal normale, b→ tube contourné proximal normale avec bordure en brosse intacte, c→ espace intratubulaire conservé (×40).

(A)



(B)



(C)

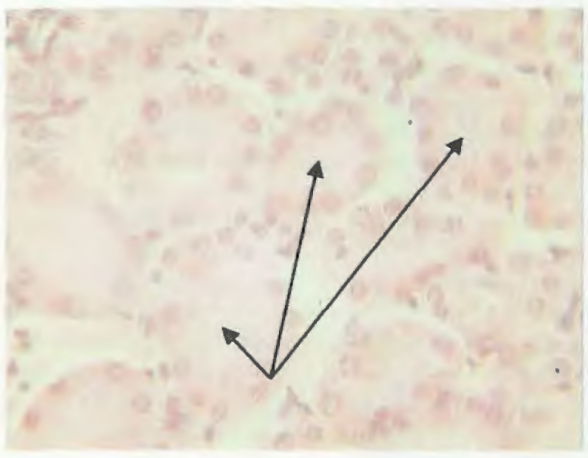


Figure 22 : Photomicrographie de l'examen histopathologique des reins de rats traités par la doxorubicine liposomale pégylée (hématoxyline & éosine). (A) vue d'ensemble du cortex rénal (×10), (B) médullaire rénale (papilles rénaux), absence de dépôts protéiques (×40), (C) tubules contournés proximaux conservés, bordure en brosse intacte (flèches) (×40).

Discussion & conclusions

Actuellement, la chimiothérapie anticancéreuse constitue un grand espoir en cancérologie. Elle utilise des substances qui interfèrent avec l'ADN et avec le métabolisme cellulaire.

L'un des principaux objectifs d'un traitement anticancéreux est de délivrer des quantités suffisantes de médicaments à des tumeurs ciblées et de minimiser les dommages pour les tissus normaux. Beaucoup d'agents chimiothérapeutiques mais cytotoxiques pénètrent dans les tissus normaux du corps sans préférence pour les sites tumoraux. La dose qui atteint la tumeur peut être aussi peu que 5-10% que la dose accumulée dans les organes normaux, à cause de la pression de fluide interstitiel dans la tumeur solide qui est plus élevée à celle des cellules normaux (bosslet et al., 1998 et heldin et al., 2004). Ceci conduit à la diminution du transport transcapillaire de ces agents anticancéreux dans les tissus tumoraux. Les cellules cancéreuses sont donc exposées à des concentrations moins effectives, alors que le reste du corps peut être le sujet d'une toxicité élevée et d'une efficacité moindre.

Ce phénomène limite souvent la dose du médicament anticancéreux qui peut être donnée à des patients sans effets secondaires, résultant une réponse tumorale incomplète, une rechute précoce de la maladie et une résistance à la drogue (Chang et al., 2009).

La doxorubicine est une substance antitumorale couramment utilisée pour le traitement du cancer en raison de ses modes d'actions multiples, y compris l'inhibition de l'ADN hélicases, la topoisomérase II et de l'ARN polymérase (Gewirtz, 1999). Cependant, son utilisation en chimiothérapie a été limitée en grande partie grâce à ses diverses toxicités, notamment la toxicité rénale, cardiaque, hématologique et testiculaire (Yilmaz et al., 2006).

En dépit du volume des recherches effectuées, les mécanismes biochimiques par lesquels la doxorubicine cause la néphrotoxicité n'ont pas été clairement définit (Elbeg et Turkozkan, 2001), mais qui peuvent être due à la formation des radicaux libres, des dommages oxydatifs fer-dépendant des macromolécules biologiques et la peroxydation des lipides membranaires (Pritsos et Ma, 2000).

Il a été suggéré que la doxorubicine sous la forme de semiquinone joue un rôle majeur dans son action néphrotoxique. Les semiquinones sont instables dans des conditions aérobique ainsi elles génèrent le radicale anion superoxyde par la réaction avec l'oxygène moléculaire. Une fois les radicaux libres initialement augmentés, l'infiltration locale des neutrophiles et l'activation des cellules mésangiales glomérulaires continuent la production des radicaux libres causant les dommages tissulaires rénaux (Deman et al., 2001).

La découverte des liposomes comme transporteurs universelle a permis le développement de divers systèmes de délivrance des enzymes, de l'ADN, de médicament et d'autres composés chimiques (Zuzanna et Agata, 2010). Par comparaison à des méthodes d'administrations conventionnelles des agents chimiothérapeutiques, la nanomédecine à base de lipides ou de polymères a montré l'avantage d'améliorer les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des médicaments cytotoxiques (Allen et Cullis, 2004).

Plusieurs petites molécules de chimiothérapie comme la doxorubicine ont un large volume de distribution lors de leurs administrations intraveineuses et un étroit index thérapeutique. Par l'encapsulation de la doxorubicine dans des particules de transport « liposomes », son volume de distribution est significativement réduit et sa concentration dans la tumeur est augmentée. La possibilité de modifier la formule de ces liposomes joue un rôle dans leurs vastes applications (Zuzanna et Agata, 2010). En effet, le couplage des liposomes de doxorubicine avec le polyéthylène glycol (PEG) donne naissance à des liposomes pégylés qui possèdent un large temps de demi-vie plasmatique. Ce couplage est considéré comme ayant un large potentiel dans le système de transport de médicament (Senior et al., 1991).

Dans des études précliniques (Papahadjopoulos et al., 1991) et cliniques (Safra et al., 2000), la doxorubicine liposomale pégylée a été signalé pour réduire la toxicité systémique et pour améliorer l'index thérapeutique de la forme conventionnelle du médicament.

Plusieurs investigateurs ont montré dans leurs études menées sur des rats normaux que la doxorubicine induit une néphrotoxicité (Squadrito et al., 1992, Djukanovic et al., 1994, Jovanovic et al., 1996).

Dans notre étude, nous avons remarqué une augmentation significative des concentrations de la créatininémie dans le groupe d'animaux recevant le médicament seul, résultats en accord avec ceux de Lahouel (1985) et renforcent ceux de Venkatesan (2000) et Mohan (2010) qui signifient une altération de la filtration glomérulaire. Par contre, nous avons enregistré une diminution de la concentration de la créatinine plasmatique chez le groupe d'animaux traités par les liposomes vides et la doxorubicine liposomale pégylée ceci offre une protection contre la néphrotoxicité causée par la molécule mère non encapsulée.

Cette augmentation de la créatininémie induite par la doxorubicine seule à une dose de 10 mg/kg est confirmée par la diminution de la clairance plasmatique ce qui suggère que le débit de filtration glomérulaire a été clairement réduit, permettant d'expliquer une réduction du

volume de plasma épuré par minute. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Raguenez-viotte et al., (1988). Alors que le débit de filtration glomérulaire reste intact chez les groupes des rats traités par la doxorubicine liposomale et par les liposomes vides, ceci a été conclu d'après ce que nous avons trouvé lors de la comparaison entre les taux de la clairance de la créatinine chez les deux groupes avec ceux des témoins.

Au cours du syndrome néphrotique provoqué par la doxorubicine à 10 mg/kg, des modifications lipidiques ont été connues de longue date avec une augmentation de la synthèse des lipoprotéines et une diminution de leurs catabolismes (Lahouel, 1985), l'altération de la composition des triglycérides et une réduction de l'activité de la lipoprotéine-lipase et de la triglycéride-lipase hépatique y contribuent (Attman et al., 1993).

Dans notre étude, l'hyperlipémie est nette dés le 7 jour après l'injection de la doxorubicine caractérisée par une augmentation des triglycérides plasmatiques, elle est encore plus importante au 15ème jour, moment où le syndrome néphrotique est le plus important.

Des études expérimentales ont fourni des données *in vivo* et *in vitro* pour soutenir l'idée que la dyslipidémie contribue aux lésions glomérulaires, tubulaires et interstitielles du parenchyme rénal (Keane, 2000). Alors que des études cliniques ont montré que l'hypertriglycéridémie caractérise le profil lipidique des patients atteint d'une insuffisance rénale chronique. Ainsi, Samuelsson et al. (1997) ont trouvé que le déclin de la fonction rénale a été corrélé avec le taux de triglycérides et du HDL-cholestérol (Samuelsson et al., 1997). Les mécanismes par lesquels l'hyperlipémie accélère la progression de l'atteinte rénale demeure largement inconnus. Chez l'animal, elle augmente la pression intraglomérulaire, ce qui active la prolifération mésangiale et favorise la production de la fibronectine (Keane, 1994).

Nous avons observé, des taux de triglycéride plasmatique très peu modifiés entre les deux groupes de rats recevant la doxorubicine liposomale pégylée et les liposomes vides par rapport à ceux du groupe témoin, ce qui révèle que la fonction rénale chez les rats de ces deux groupes reste intacte du fait que leurs profil lipidique « triglycéridémie normale » ne varie pas avec celui de l'état normal, ceci nous laisse penser que ces nouvelles formulations du médicament anticancéreux donne une protection vis-à-vis de l'effet néphrotoxique causé par la drogue libre.

Le stress oxydatif est largement accepté comme étant un composant critique de plusieurs et peut être de la plupart des voies pathologiques. C'est un syndrome au cours duquel les éléments prooxydants dépassent la capacité antioxydante de l'organisme. Il en résulte un déséquilibre entre les deux (Temple, 2000). De nombreuses situations peuvent être à l'origine d'introduction ou de production de ces oxydants dans l'organisme, le traitement par la doxorubicine figure parmi eux. Il est à l'origine de la production probable des ROS responsable de sa toxicité et de ces effets néfastes.

La relation entre le stress oxydatif et la néphrotoxicité a été documenté dans plusieurs modèles expérimentaux réalisés sur les animaux. Divers études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les métabolites réactifs de l'oxygène incluant l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène sont des médiateurs très importants de la toxicité tissulaire (Fantone et Ward, 1992). En 1987 Shah et ces collaborateurs ont montré que ces radicaux libres oxygénés ont été impliqué dans plusieurs processus potentiellement important des maladies glomérulaires (Shah et al., 1987).

Le stress oxydatif peut entraîner des altérations moléculaires et cellulaires dont les plus sensibles à l'action des radicaux libres sont les lipides (Goudable et Favier, 1997) conduisant à la peroxydation lipidique, qui est le résultat de l'interaction entre ces radicaux libres de divers origines et les acides gras polyinsaturé généralement trouvé dans les membranes lipidiques. Le résultat net de cet événement se traduit par l'accumulation de divers peroxydes lipidiques et de malondialdehyde (MDA) (Petal et al., 2010). Il y a beaucoup d'investigations qui suggèrent que la peroxydation lipidique joue un rôle critique dans la toxicité rénale induite par les radicaux libres, donc elle a été utilisé comme un indicateur sensible de la cytotoxicité induite par les oxydants (Hickey et al., 2000).

Le taux du MDA tissulaire est reporté pour être un marqueur fiable de la peroxydation lipidique. En effet, dans notre étude réalisée *in vivo* sur le rein, nous avons trouvé une augmentation significative des taux du MDA dans le groupe d'animaux recevant le médicament seul, cette augmentation est un indicateur de la toxicité rénale de la doxorubicine.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Yilmaz et al. (2006) et de Malarkodi et al. (2003), leurs travaux réalisés sur le rein montrent que le traitement des rats par la doxorubicine à une dose unique augmente de façon significative le taux du MDA dans le tissu rénal. De même, une étude expérimentale de Behling et al. (2006) montre que l'administration de cisplatine à

une dose de 5 mg/kg augmente la peroxydation lipidique et les taux du MDA dans les tissus rénaux et conduit à un état de néphrotoxicité.

Par contre nous avons enregistré une diminution des taux de MDA chez les rats traités par la doxorubicine liposomale pégylée et les liposomes vides, cette réduction renforce l'effet protecteur du système liposomale contre la toxicité des métabolites réactifs générés au cours de la métabolisation de la doxorubicine par le cytochrome P450, ce qui nous laisse penser que la synthèse du radical hydroxyle OH°, responsable des dommages lipidiques, n'aura pas lieu.

Toutefois, les effets potentiellement délétères des espèces radicalaires sont contrôlés par la présence de systèmes de protection efficaces antioxydants enzymatiques (SOD, CAT et GST) ou non enzymatiques (GSH) et qui maintiennent les ROS à de faibles concentrations. L'équilibre existant entre la production de ROS et les défenses antioxydantes permet ainsi de préserver l'intégrité de la cellule (Vergely et Rochette, 2003).

Les taux de glutathion enregistrés chez les rats traités par la doxorubicine seule sont inférieurs à ceux des témoins. Cette diminution est essentiellement due à l'effet toxique des métabolites réactifs instable du médicament qui sont fixés et neutralisés par le système de détoxification provoquant ainsi la baisse des concentrations du GSH. On admet aussi aujourd'hui que la formation des métabolites de la doxorubicine, quand elle est importante, consomme du glutathion et que cela aboutit à une déplétion du glutathion ce qui a pour principale conséquence la peroxydation lipidique et une oxydation des groupes thiols de protéine.

Nos résultats sont similaires à ceux de Simic et al. (1996) qui montrent que les taux du GSH rénaux sont significativement réduits due au traitement par la doxorubicine, plusieurs auteurs proposent que la détérioration des mécanismes de défenses antioxydantes puisse permettre l'aggravation des dommages rénaux induits par les radicaux libres.

Ibrahim et al. (2009) ont trouvé, chez des rats Wistar albinos traités par la doxorubicine, une élévation des taux de MDA et une diminution des taux de GSH dans les tissus rénaux et cardiaques (Ibrahim et al., 2009). Aussi, les travaux de Liu et al., (2008) réalisés après l'administration de cisplatine à 8 mg/kg, confirment que la néphrotoxicité induite par les traitements anticancéreux serait associée à la déplétion du GSH dans le tissu rénal (Liu et al., 2008).

En plus, le GSH est aussi un substrat clef pour les enzymes antioxydantes telle que les glutathion S- transférase (GST) qui neutralisent le peroxyde hydrogène et le peroxyde

lipidique. Les GSTs sont connues pour jouer un rôle clef dans la détoxification et la réduction des radicaux libres oxygénés. Elles inactivent des composés électrophiles toxiques et des produits de la peroxydation lipidique (4-hydroxynonénal) en les conjuguant au glutathion (Desmots et Guillouzo, 2000). Outre ce principal rôle, les GSTs peuvent avoir des activités peroxidase, isomérase, ethérase ou thiol transférase (Todorova, 2007).

Les antioxydants enzymatiques de piégeage des radicaux libres constituent la première ligne de protection contre les dérivés radicalaires de l'oxygène (Mohan et al., 2010), L'action de la superoxyde dismutase (SOD) doit toutefois être couplée à celle d'enzymes qui dégradent le peroxyde d'hydrogène, comme les catalases (CAT) ou les glutathion peroxydases (GPx), afin d'éviter l'augmentation des concentrations en H_2O_2, ce qui en présence de fer induirait fatalement la formation de radical hydroxyle par la réaction de Fenton (Vergely et Rochette, 2003). En effet, l'équilibre entre ces enzymes est le processus principal d'élimination effective du stress oxygéné dans les organelles intracellulaires (Singal et al., 2000).

Des études expérimentales, dans lesquelles le système antioxydant enzymatique a été étudié, ont montré qu'une anomalie du taux de la SOD a été signalée au cours du syndrome néphrotique. Les résultats d'Alis et ces collaborateurs (2008) montrent une augmentation significative de la SOD du tissu rénale après le traitement par l'adriamycine à une dose de 5 mg/kg. Dans le même profil, Zima et al. (1997) ont trouvé que cette concentration ne change pas par rapport à celle du témoin. Alors que le travail de Pedraza et al. (1995), dans le cas de la néphrotoxicité causée par l'aminonucléoside puromycine, a donné comme résultat une diminution du taux de la SOD.

Dans notre étude, la diminution de la concentration de la SOD a été observée dans le groupe de rats traités par la doxorubicine, cette diminution peut donner comme conséquence une réduction de l'élimination de l'anion superoxyde, qui est largement nocif pour les reins.

Par contre l'amélioration de l'activité de la SOD dans le groupe des rats recevant la doxorubicine liposomale pégylée et les liposomes vides, peut être due à la protection fournie par ces formulations, via l'empêchement de la perturbation du système antioxydant causé par le traitement de la doxorubicine nue.

Le changement du statut antioxydant rénal trouvé au cours du traitement par la doxorubicine, a été démontré par la diminution de la dismutation de l'anion superoxyde par la SOD, cette réduction a été aussi renforcée par la diminution du taux de la catalase témoin d'une complémentarité entre ces deux enzymes pour supprimer les espèces radicalaires de

l'oxygène. La catalase est également responsable de l'élimination d'H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2. Son affinité pour l'H_2O_2 est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues. La détérioration de l'activité catalasique a été détournée suite à l'injection des liposomes vides et de la doxorubicine liposomale pégylée.

La néphrotoxicité induite par la doxorubicine chez l'animale est un model largement accepté dans les néphropathies expérimentaux qui reproduit des aspects sévères des néphroses idiopathique humaine et des scléroses glomérulaires (Bertelli et al., 1991). Saad et al en 2001, ont montré que la doxorubicine induit des changements dans le tissu rénal des rats traités caractérisés par une augmentation de la perméabilité des capillaires glomérulaire et une atrophie tubulaire (Saad et al., 2001).

La perte de la fonction rénale chez les rats souffrants d'un syndrome néphrotique induit par cet anticancéreux a été associée à des anomalies structurelles, glomérulaires et tubulaires, généralisées.

La plupart des glomérules examinés dans la présente étude expose un préjudice caractérisé par une rétraction ischémique glomérulaire importante donnant naissance à un espace de Bowman extrêmement élargie, alors que des blessures tubulaires sont généralement considérés comme secondaires à des lésions glomérulaires et une protéinurie. Le volume interstitiel a été augmenté et le nombre de profils tubulaires qui semblait être normale a été nettement réduit, ces profils exposent des changements atrophiques caractérisés par la perte de la bordure en brosse des tubules contournés proximaux, l'atténuation du cytoplasme des cellules épithéliales tubulaires et des dépôts protéiques importantes, ainsi qu'une infiltration mononucléaire.

Nos observations sont similaires à celles déjà obtenue par Yilmaz et al. (2006), Liu et al. (2007), Ibrahim et al. (2009) et Mohan et ces collaborateurs en 2010.

Les lésions tissulaires constatées chez les rats traités par le médicament nu sont significativement réduites après l'injection IV de la doxorubicine encapsulée et liposomes vides, suggérant que ces formulations préservent l'architecture normale du parenchyme rénal manifesté par la conservation de glomérules, de tubules contournés proximaux et distaux avec disparition totale de l'inflammation, des nécroses cellulaires et des dépôts protéiques.

Conclusion générale

La néphrotoxicité induite par la doxorubicine est le résultat d'un grand volume de distribution et d'une accumulation rénale importante de ce médicament. Alors, le recours à une nouvelle formulation, qui est l'encapsulation dans des liposomes, avait pour objectifs l'amélioration des paramètres pharmacocinétiques, de l'efficacité ainsi que la réduction de la toxicité de la molécule mère. Cependant, les données sur la toxicité de la forme du médicament encapsulée sont eux même le sujet de beaucoup de travaux de recherches.

Ainsi et pour une meilleure sécurité d'emploi de la doxorubicine liposomale, l'évaluation des paramètres biochimiques, du stress oxydatif rapporté avec la forme nue et encapsulée ont été clairement montrés. De même une comparaison de l'effet néphrotoxique de ces formes médicamenteuses a été étudiée.

Les premiers résultats obtenus dans notre étude établie *in vivo* chez le rat Wistar, présentent nettement un effet bénéfique de la doxorubicine liposomale pégylée sur le tissu rénal à travers :

- La limitation des effets délétères de la doxorubicine et la protection de la fonction rénale, démontré par la diminution des taux de la créatinine sérique et des triglycérides plasmatiques, ainsi par l'augmentation de la clairance de la créatinine ;
- La protection des membranes cellulaires contre les effets nocifs des ROS, par inhibition de la peroxydation lipidique et la diminution des taux du MDA ;
- Le maintient du statut antioxydant enzymatique et non enzymatique cellulaire noté par la conservation du taux de GSH et l'augmentation des activités enzymatiques de SOD, CAT et GST.

Ces résultats ont été renforcés par l'examen microscopique des sections rénales qui ont montré une conservation de la structure rénale, une protection des glomérules et des tubules contre l'agression connu d'être causée par la forme libre de la doxorubicine.

D'après les résultats de notre étude, la doxorubicine liposomale pégylée semble présenter un intérêt réel et potentiel par sa faible néphrotoxicité comparée à celle induite par la doxorubicine libre.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de notre présente étude, nous ont permis de vérifier l'intérêt des formulations liposomales de doxorubicine et ce à travers la réduction des effets secondaires sur la fonction rénale. Cependant, cette étude a été réalisée sur des animaux

sains et dans ce cas les résultats ne pourront être exploitables en clinique que si on vérifie que la forme encapsulée conserve toute son efficacité anticancéreuse sur un modèle de tumeur expérimentale tout en réduisant ses effets secondaires. Ce qui constitue alors l'une de nos perspectives en plus de :

- L'évaluation du stress oxydatif que peut provoquer la doxorubicine liposomale sur les différentes fonctions mitochondriales.
- Elargir l'étude en évaluant les différents paramètres de l'apoptose et la nécrose cellulaire dans le tissu rénale (caspases, Bcl-xL, l'expression de p53,….. etc.) au cours du traitement par la doxorubicine liposomale pégylée.
- Faire d'autres études approfondies pharmacocinétique et pharmacodynamique de la doxorubicine encapsulée qui seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

Références bibliographiques

1- Abdel-Wahab MH, Al-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F et Hamada FMA. (2003). Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rats heart. Pharm Res; 48: 461-465.

2- Alis M, Bulucu F, Baykal Y, Yamanel L, Inal V, Serdar M, Avci A, Aydin A. (2008). Oxidative stress status in renal tissues and plasma of experimental nephritic syndrome. OJTSN; 17(2): 63-68.

3- Allen TM. (1994). The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. Adv Drug Del Rev; 13: 285–309.

4- Allen TM, Cullis PR. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. Science; 303: 1818–1822.

5- Andersen A, Holte H, Slørdal L. (1999). Pharmacokinetics and metabolism of doxorubicin after short-term infusions in lymphoma patients. Cancer Chem Pharm; 44(5): 422-426.

6- Attman PO, Samuelsson O, Alaupovic P. (1993). Lipoprotein metabolism and renal failure. Am J Kidney Dis; 21: 573-92.

7- Bababunmi EA, Bach P, Baverel G, Berndt WO, Duggin G, Endou H, Goyer R, Robbins M, Cojocel C, Berger JC, Smith E, Bernard A, Druet P, Mutti A. (1991). Principles and methods for the assessment of nephrotoxicity associated with exposure to chemicals (serial online). Available from: URL : http:// www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc119.htm

8- Bach PH, Obatomi DK, Brant S. In vitro models for nephrotoxicity screening and risk assessment. (1997). In: Castell J.V. et Gomez-Lechon M.J, eds. In vitro methods in pharmaceutical Research. Valencia: Academic Press; p. 55-101.

9- Bachur NR, Hildebrand RC, Jaenke RC. (1974). Adriamycin and Daunorubicin disposition in the rabbit. J Pharm; 191(2): 331-340.

10- Bacot S. (2004). Caractérisation d'un nouvelle aldéhyde d'origine plaquettaire (4-Hydroxydodecadienal) et formation d'adduit de Michael avec les phospholipides a ethanolamine (thèse).France : Université de Lyon ; p. 75-81.

11- Bagshaw SM, Bellomo R. Insuffisance rénale aigue : définition,épidémiologie et Pronostique. (2007). In Laurent J, eds. Inssuffisance rénale aigue. Paris : Springer-Verlag; p. 13-30.

12- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol; 13: 238–252.

13- Barbey MM, Fels LM, Soose M, Poelstra K, Gwinner W, Bakker W, Stolte H. (1989). Adriamycin Affects Glomerular Renal Function: Evidence for the Involvement of Oxygen Radicals. Free Radical Res; 7(3-6): 195-203.

14- Behling EB, Sendao MC, Heloisa DC, Franciscato HDC, Antunes LMG, Costa RS, Bianchi MLP. (2006). Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. Pharmacol report; 58: 526-532.

15- Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G, Donati MB. (1982). Adriamycin induced nephrotic syndrome in rats- sequence of pathologic events. Lab Invest; 46: 16-23.

16- Bertani T, Cutillo F, Zoja C, Broggini M, Remuzzi G. (1986). Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. Kidney Int; 30: 488-496.

17- Bertelli R, Ginevri F, Gusmano R, Ghiggeri G. (1991). Cytotoxic effect of adriamycin and agarose-coupled adriamycin on glomerular epithelial cells. In vitro Cell Dev Biol; 27 (A): 799-804.

18- Bohman SO, Jaremko G, Bohlin AB, Berg U. (1984). Foot process fusion and glomerular filtration rate in minimal change nephrotic syndrome. Kidney Int; 25: 696-700.

19- Bonsnes RW, Tausky HH. (1945). On the colorimetric determination of creatinine by the jaffe reaction. J Biol Chem; 158: 581-600.

20- Bosslet K, Straub R, Blumrich M, Czech J, Gerken M, Sperker B, Kroemer HK, Gesson J P, Koch M, Monneret C. (1998). Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. Cancer Res; 58: 1195–1201.

21- Brunette MG. Régulation du métabolisme calcique. (1997). In : Offenstadt G, Brunette MG, eds. Désordres acido-basiques et hydroélectrolytiques. Paris: Arnette Blackwell ; p. 294-312.

22- Bulucu F, Vural A, Ayden A, Sayal A. (2000). Oxidative stress status in adults with nephrotic syndrome. Clin Nephrol; 53: 169-173.

23- Chang DK, Chiu CH, Kuo SY, Lin WC, Lo A, Wang YP, Li PC, Wu HC. (2009). Antiangiogenic Targeting Liposomes Increase Therapeutic Efficacy for Solid Tumors. J Biol Chem; 284(19): 12905–12916.

24- Claiborne A. Catalase activity. (1985). In: Greenwald RA, eds. CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press: Boca Raton; p. 283-284.

25- Deman A, Ceyssens B, Pauwels M, Zhang J, Houte Verbeelen KV, Houte KV, Verbeelen D, Branden CVD. (2001). Altered antioxidant defence in a mouse adriamycin model of glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant; 16(1): 147-150.

26- Desmots F, Guillouzo A. (2000). Caractérisation d'un nouveau gène codant une glutathion transférase de la classe alpha, la GSTA4, étude de sa régulation au cours de la régénération hépatique et de la surcharge en fer (thèse). Paris: Université de Rennes 1; p. 1-226.

27- Devine DV, Marjan JMJ. (1997). The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation. CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst; 14: 105–131.

28- Djukanovic G, Susic D, Jovanovic J, Varagic J, Jovanovic D, Starcevic A, Kartaljevic G, Bogdanovic G. (1994). Effects of captopril and hydralazine on progression of adriamycin nephropathy in spontaneously hyper-tensive rats. Isr J Med Sci; 30(10): 742-746.

29- Dogra G, Ward N, Croft KD, Mori TA, Barret PH, Herrmann SE, Irish AB, Watts G. (2001). Oxidant stress in nephrotic syndrome: Comparison of F(2)-isoprostanes and plasma antioxidant potential. Nephrol Dial Transplant; 16: 1626-1630.

30- Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. (1999). Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. Pharm Rev; 51(4): 691-743.

31- Egido J, Robles A, Ortiz A, Ramirez F, Gonzalez E, Mampaso F, Gespo MS, Braquet P, Hernando L. (1987). Role of platelet-activating factor in adriamycin-induced nephropathy in rats. Eur J Pharmacol; 138(1): 119-123.

32- Elbeg S, Turkozkan N. (2001). The Effect of Vitamin E on Free Radical-Mediated Adriamycin Toxicity in Guinea Pig Kidney. T Klin J Med Res; 19: 131-135.

33- Ellman GL. (1959). Plasma antioxydants. Archi Biochem Biophys; 82: 70-77.

34- Embree L, Gelmon KA, Lohr A, Mayer LD, Coldman AJ. (1993). Chromatographic analysis and pharmacokinetics of liposome-encapsulated doxorubicin in non-small- cell lung cancer patients. J Pharm Sci; 82: 627–634.

35- Fantone JC, Ward PA. (1992). Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am J Pathol; 107: 397-418.

36- Farquhar MG. (2006). Glomerular basement membrane : not gone, just forgotten. J Clin Invest; 116(8): 2090-2093.

37- Frey J, Daudon M, Raby N, Augereau C, Dechaux M, Diehl JL, Sicallac P, Bonneau C. (2001). Valeur séméiologique des paramètres biochimiques urinaires. Ann Bio Clin; 29(1): 13-25.

38- Fridovich I et Beauchamp C. (1971). Assay of superoxide dismutase. Anal Biochem ;44: 276-287.

39- Gabizon A, Chisin R, Amselem S, Druckmann S, Cohen R, Goren D, Fromer I, Peretz T, Sulkes A, Barenholz Y. (1991). Pharmacokinetic and imaging studies in patients receiving a formulation of liposome-associated adriamycin. Br J Cancer; 64: 1125–1132.

40- Gabizon AA, Barenholz Y, Bialer M. (1993). Prolongation of the circulation time of doxorubicin encapsulated in liposomes containing polyethylene glycol-derivatized phospholipid: Pharmacokinetic studies in rodents and dogs. Pharm Res; 10: 703– 708.

41- Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T. (1994). Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. Cancer Res; 54: 987–992.

42- Gabizon A, Martin F. (1997). Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Drugs; 54(4): 15–21.

43- Gewirtz DA. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochem Pharmacol; 57: 727–741.

44- Gordon MK, Peter HB. (1995). Enhanced Hexachloro-1 :3-butadiene nephrotoxicity in rats with a preexisting adriamycin-induced nephrotic syndrome. Toxicol Patho; 23(3): 303-312.

45- Goudable J, Favier A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutr Clin Metabol; 11(2) :115-120.

46-Goutayer M. (2008). Nano-émultions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo (thèse). Paris : Université Pierre et Marie curie ; p. 1-241.

47- Goyal P, Goyal K, Kumar SGV, Singh A, Katare OP, Mishra DN. (2005). Liposomal drug delivery systems- clinical applications. Acta Pharm; 55: 1-25.

48- Greene RF, Collins JM, Jenkins JF, Speyer JL, Myers CE. (1983). Plasma pharmacokinetis of Adriamycin and Adriamycinol : Implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. Cancer res; 43: 3417-3421.

49- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974). Glutathion –S-transférase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem; 249: 7130-7139.

50- Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. (2004). High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. Nat Rev Cancer; 4: 806–813.

51- Hickey EJ, Raje RR, Reid VE, Gross SM, Ray SD. (2001). Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. Free Radic Biol Med; 31(2): 139-152.

52- Hofheinz RD, Gnad-Vogt SU, Beyer U, Hochhaus A. (2005). Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. Anticancer Drugs; 16: 691–707.

53- Hou XW, Jiang Y, Wang LF, Xu HY, Lin HM, He XY, He JJ, Zhang S. (2009). Protective role of granulocyte colony-stimulating factor against adriamycin-induced cardiac, renal and hepatic toxicities. Toxicol Lett; 187: 40-44.

54- Huang SK, Mayhew E, Gilani S, Lasic DD, Martin FJ, Papahadjopoulos D. (1992). Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma. Cancer Res; 52: 6774–6781.

55- Huwyler J, Drewe J, Krahenbuhl S. (2008). Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. Int J Nanomedicine; 3(1): 21-29.

56- Ibrahim MA, Ashour OM, Ibrahim YF, El-Bitar HI, Gomaa W, Abdel-Rahim SR. (2009). Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensine AT1-receptor antagonism equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. Pharm Res; 60: 373-381.

57- Ichikawa M. (1994). Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. Kidney Int; 45:1-9.

58- Immordino ML, Dosio F, Cattel L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rational, and clinical application, existing and potential. Int J Nanomedicine; 1(3): 279-315.

59- Iqbal M, Som DS, Yasumasa O, Masayoshi F, Shigero O. (2003). Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddy male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. Pharmacol Toxicol; 92: 33-38.

60- Ito K, Ger YC, Kawamura S. (1986). Actin filament alterations in glomerular epithelial cells of adriamycin-induced nephritic rats. Acta Pathol Jpn; 36(2): 253-60.

61- Jain RK. (1990). Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. Cancer Res; 50(3): 814–819.

62- Jovanovic D, Djukanovic I, Susic D, Funduk G, Jovanovic Z, Dragojlovic Z, Boydanovic G, Starcevic- Bonzovic Z. (1996). The effect of captopril on the development of adriamycin nephropathy in rats with spontaneous arterial hypertension. Srp Arh Celok Lek; 124(1): 47-49.

63- Keane WF. (1994). Lipids and the kidney. Kidney Int; 46: 910-920.

64- Keane WF. (2000). The role of lipids in renal disease: Future challenges. Kidney Int; 57: 27-31.

65- Krishna R, Mayer LD. (1999). The use of liposomal anticancer agents to determine the roles of drug pharmacodistribution and P-glycoprotein (PGP) blockade in overcoming multidrug resistance (MDR). Anticancer Res; 19: 2885–91.

66- Labescat J. Guide des examens complémentaires. Paris : Lamarre ; 2008.

67- Laginha K, Mumbengegwi D, Allen T. (2005). Liposomes targeted via two different antibodies: Assay, B-cell binding and cytotoxicity. Biochim Biophys Acta; 1711: 25–32.

68- Lahouel M. (1985). Etude de la toxicité hématologique hépatique et rénale de deux médicaments anticancéreux: la doxorubicine et le CCNU chez le rat (thèse). Paris : Université de Haute Normandie ; p. 1-220.

69- Lahouel M, Fillastre JP. (2004). Role of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents. Haema; 7(3): 313-320.

70- Lasic DD, Papahadjopoulos D. (1995). Liposomes Revisited. Science; 267: 1275-1276.

71- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Ann Intern Med; 130: 461-470.

72- Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. (2000). Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. Chem Res Toxicol; 13: 414–420.

73- Lin H, Hou CC, Cheng CF, Chiu TH, Hsu YH, Sue YM, Chen TH, Hou HH., Chao YC,Cheng TH, Chen CH. (2007). Peroxisomal proliferator activated receptor-alpha protects renal tubular cells from doxorubicin-induced apoptosis. Mol Pharm; 72(5):1238-1245.

74- Liu LL, Li QX, Xia L, Li J, Shao L. (2007). Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. Toxicology; 231: 81-90.

75- Liu XH, Li J , Li QX, Ai YX , Zhang L. (2008). Protective effects of ligustrazine on cisplatin-induced oxidative stress, apoptosis and nephrotoxicity in rats. Environ Toxicol Pharmacol; 26: 49-55.

76- Malarkodi DP, Balachandar AV, Varalakshmi P. (2003). The influence of lipoic acid on adriamycin- induced nephrotoxicity in rats. Mol Cell Biochem; 243: 15-22.

77- Marcot I, Migeon C, Parache RM, Marchal S, Virion JM. (1997). Etude comparative de la quantification des récepteurs hormonaux dans les cancers du sein par immunocytochimie et biochimie. Bull Cancer ; 84(6): 613-18.

78- Marshall WJ, Bangert SK. Biochimie médicale : physiopathologie et diagnostic. Paris: Elsevier; 2005.

79- Martin FJ. (1997). Pegylated liposomal Doxorubicine: scientific rational and preclinical pharmacology. Oncology; 11 (suppl 11): 11-20.

80- Mayhew EG, Lasic D, Babbar S, Martin FJ. (1992). Pharmacokinetics and antitumor activity of epirubicin encapsulated in long-circulating liposomes incorporating a polyethylene glycol- derivatized phospholipid. Int J Cancer; 51: 302-309.

81- Minotti G, Recalcati S, Mordente A, Liberi G, Calafiore AM, Mancuso C, Preziosi P, Cairo G. (1998). The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. FASEB J; 12: 541-552.

82- Minotti G, Cairo G, Monti E. (1999). Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? .FASEB J; 13: 199–212.

83- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. Pharmacol Rev; 56: 185-229.

84- Mohan M, Kamble S, Gadhi P, Kasture S. (2010). Protective effect of *Solanum Torvum* on docorubicin induced nephrotoxicity in rats. Food Chem Toxicol; 48: 436-440.

85- Myers CE. (1998). The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. Semin Oncol; 25 (10):10–14.

86- Nakhoul F, Ramadan R, Khankin E, Yaccob A, Kositch Z, Lewin M, Assady S, Abassi Z. (2005). Glomerular abundance of nephrin and podocin in experimental nephritic syndrome: different effects of antiproteinuric therapies. Am J Physiol Renal Physiol; 289: 880-890.

87- Northfelt DW, Martin FJ, Working P, Volberding PA, Russell J, Newman M, Amantea MA, Kaplan LD. (1996). Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: Pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. J Clin Pharmacol; 36: 55– 63.

88- Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. Anal Biochem ; 95: 351-358.

89- Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang BK, Boucek RJ. (1988). Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. Proc Natl Acad Sci USA; 85: 3585-3589.

90- Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, Lee KD, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. Proc Natl Acad Sci USA; 88: 11460–11464.

91- Papahadjopoulos D, Gabizon AA. Sterically stabilized (Stealth®) liposomes: Pharmacological properties and drug carrying potential in cancer. (1995). In: Philippot JR et Schuber F, eds. Liposomes as Tools in Basic Research and Industry. Boca Raton, FL: CRC Press; p. 177-188.

92- Park ES, Kim SD, Lee MH, Lee HSS, Lee IS, Sung JK, Yoon YS. (2003). Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats. J Vet Sci; 4(2): 129-136.

93- Park JW, Benz CC, Martin FJ. (2004). Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. Semin Oncol; 31: 196–205.

94-Patel J. (1996). Liposomal doxorubicin: Doxil. J oncol Pharm Pract; 2(4): 201-210.

95- Patel N, Joseph C, Corcoran GB, Ray SD. (2010). Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. Toxicol App Pharmacol; 245 (2): 143-152.

96- Pedraza-Chaverri J, Arevalo AE, Hernandez-Pando R, Larriva- Sahd J. (1995). Effect of dietary antioxidants on puromycin aminonucleoside nephrotic syndrome. Int J Biochem Cell Biol; 27: 683-691.

97- Pozanansky MJ, Juliano RL. (1984). Biological approaches to the controlled delivery of drugs: a critical review. Pharmacol Rev; 36: 277–336.

98- Pritsos CA, Ma J. (2000). Basal and drug-induced antioxidant enzyme activities correlate with age-dependent doxorubicin oxidative toxicity. Chem Biol Interact; 127: 1–11.

99- Raguenez-viotte G, Lahouel M, Ducastelle Th, Morin JP, Fillastre JP. (1988). CCNU Adriamycin association induces earlier and more severe nephropathy in rats. Arch Toxicol, 1988 ; 61: 282-291.

100- Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. (2007). Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac spaning effect of liposomal formulation. Int J Nanomedicine; 2(4): 547- 538.

101- Riggs CE, Benjamin RS, Serpick AA, Bachur NR. (1977). Bilary disposition of Adriamycin. Clin Pharmacol Ther; 22(2): 234-41.

102- Saad SY, Najjar TA, Al-R´ykab´y AC. (2001). The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. Pharmacol Res; 43: 211–218.

103- Safra T, Muggia F, Jeffers S, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lyass O, Henderson R, Berry G, Gabizon A. (2000). Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m^2. Ann Oncol; 11: 1029–1033.

104- Samuelsson O, Mulec H, Knight-Gibson C, Attman PO, Kron B, Larsson R, Weiss L, Wedel H, Alaupovic P.. (1997). Lipoprotein abnormalities are associated with increased rate of progression of human chronic renal insufficiency. Nephrol Dial Transplant; 12: 1908-15.

105- Seguy B. Physiologie. Paris: Maloine ; 1996.

106- Senior JH. (1987). Fate and behaviour of liposomes in vivo: A review of controlling factors. CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst; 3: 123–193.

107- Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G. (1991). Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly (ethylene glycol)-coated vesicles. Biochim Biophys Acta; 1062: 77–82.

108- Seymour LW. (1992). Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst; 9: 135–187.

109- Shah SV, Barcos WH, Basci A. (1987). Degradation of human glomerular basement membrane by stimulated neutrophils. Activation of a metallaproteinase by reactive oxygen metabolite. J Clin Invest; 79: 25-31.

110- Simic T, Mimic-Oka J, Sindjic M. (1996). Glutathione and enzymes associated with glutathione methabolism in adriamycin nephropathy. Srp Arh Celok Lek; 124: 45-47.

111- Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Hiskovic N. (2000). Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. Mol Cell Biochem; 207: 77–86.

112- Socha M. (2008). Apport des nanotechnologies dans le domaine des peptides et des protéines : Application à l'absorption par voie orale et à la furtivité (thèse). Nancy I: Université Henri Poincare ; p. 1-260.

113- Soose M, Haberstroh U, Rovira-Halbach G, Brunkhorst R, Stolte H. (1988). Heterogeneity of glomerular barrier function in early adriamycin nephrosis of MWF rats. Clin Physiol Biochem; 6: 310-315.

114- Soto B, Niaudet P. (1997). Protéinurie (chez l'adulte et l'enfant) : Orientation diagnostique. Rev Prat; 1717-22.

115- Speth PAJ, van Hoesel QGCM, Haanen C. (1988). Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. Clin Pharmacokinet; 15: 15–31.

116- Squadrito F, Macchiorelli G, Santoro G, Arcoraci, V, Trimarchi G, Sturnialo R, Nottola S, Motta P, Caputi A. (1992). Effects of captopril on the development of rat doxorubicin nephropathy. Histol-Histopathol; 7(2): 223-229.

117- Takanashi S, Bachur NR. (1976). Adriamycin metabolism in man: Evidence from urinary metabolites. Drug Metab Dispos; 4: 79–87.

118- Temple NJ. (2000). Antioxidants and disease: more question than answers. Nutrition Res; 20: 449- 459.

119- Todorova TT, Vuilleumier S, Kujumdzieva A. (2007). Role of glutathione S-transferases and glutathione in arsenic and peroxide resistance in Saccharomyces cerevisiae: a reverse genetic analysis approach. Biotech Biotech; 21: 348-352.

120- Vaage J, Donovan D, Working P, Uster P. Cellular distribution of DOXIL® within selected tissues, assessed by confocal laser scanning microscopy. (1998). In: Lasic DD , Papahadjopoulos D, eds. Medical Applications of Liposomes. New York: Elsevier Science BV; p. 275–282.

121- Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KAJR, Kalyanaraman B. (1997). Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. Biochemistry; 36: 11293–11297.

122- Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. (2000). Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. Br J Pharmacol; 129: 231-234.

123- Vergely C, Rochette L. (2003). Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. Med Ther Cardiol; 1(3) : 131-9.

124- Virot S. (2004). Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l'BB-cristalline (thèse). France : Université Claude Bernard-Lyon 1 ; p. 11-23.

125- Voutsadakis IA. (1998). Cardiotoxicity of anthracyclines. Haema; 1(4): 166-175.

126- Wang Z, Wang ZG, Liu Z. (1991). Changes of glomerular fixed anionic charge sites in adriamycin nephrosis in rats. Chin Med J; 104(2): 128-31.

127- Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DCH. (2000). Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunochemical events. Kidney Int; 58: 1797-1804.

128- Wilkinson PM, Mawer GE. (1974). The persistence of Adriamycin in man and rat. Br J Clin Pharmacol; 1: 241-247.

129- Working PK, Dayan AD. (1996). Pharmacological-toxicological expert report: CAELYX (Stealth® liposomal doxorubicin HCl) (Foreword). Hum Exp Toxicol; 15: 751–785.

130- Xu X, Persson HL, Richardson DR. (2005). Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. Mol Pharmacol; 68(2): 261-271.

131- Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, Ozer S. (2006). Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. Toxicology; 218: 164–171.

132- Yuan F, Lwunig M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK. (1994). Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. Cancer Res; 54: 352–3356.

133- Zamboni WC, Gervais AC, Egorin MJ, Schellens JHM, Zuhowski EG, Pluim D, Josef E, Hamburger DR, Working PK, Golbern G, Tonda ME, Potter DM, Eiseman JL. (2004). Systemic and tumor disposition of platinum or liposomal-cisplatin formulations in a preclinical tumor model of melanoma. Cancer Chemother Pharmacol; 53: 329–336.

134- Zamboni WC. (2005). Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents. Clin Cancer Res; 11: 8230–8234.

135- Zamboni WC. (2008). Concept and clinical evaluation of carrier-mediated anticancer agents. Clinical Pharm; 13(3): 248-260.

136- Zheng Z, schmidt-ott KM, Chua S, Foster KA, Frankel RZ, Pavlidis P, Barasch J, D'agati VD, Gharavi AGA. (2005). Mondelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. Natl Acad Sci USA; 102(7): 2502-2507.

137- Zhu QS, Xia L, Mills GB, Lowell CA, Touw IP, Corey SJ. (2006). G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3 kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. Blood; 107(5): 1847–1856.

138- Zima T, Tesar V, Stipek S, Crkovska J, Poledne R, Teminova J, Platenik J, Rychlik I, Merta M, Nemecek K. (1997). The influence of cyclosporine on lipid peroxidation and superoxide dismutase in adriamycin nephropathy in rats. Nephron; 75: 464-468.

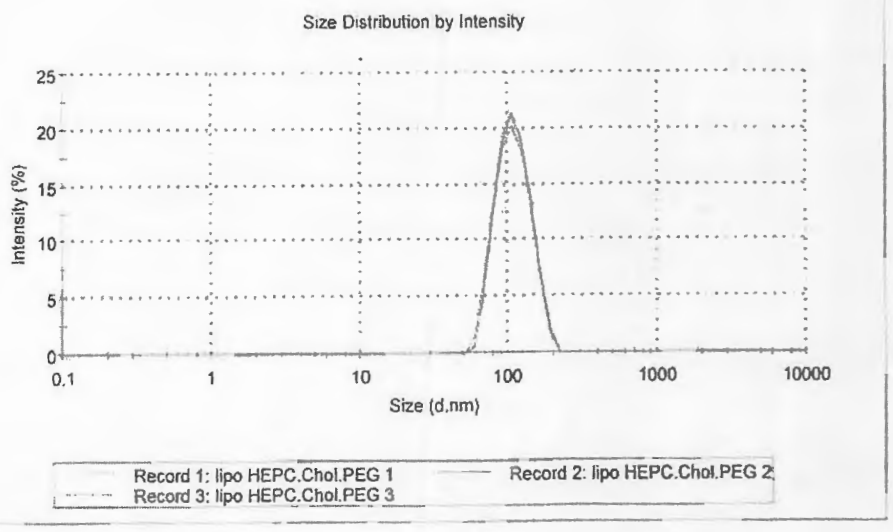
139- Zuzanna DK, Agata DJ. (2010). Liposomes as delivery systems for antibiotics. Int J Pharm; 387(1-2): 187-198.

Annexe

Le rapport du volume de distribution en fonction de l'intensité

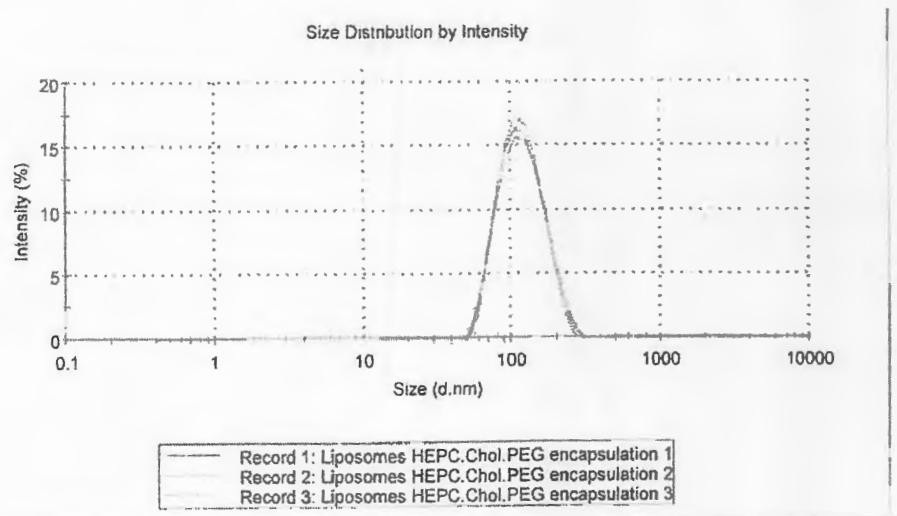
- Avant l'encapsulation de la doxorubicine

		Diamètre (nm)	% Intensité
Z-Average (d.nm): 103.1	**Pic**:	110.3	100.0



- Après l'encapsulation de la doxorubicine

		Diamètre (nm)	% Intensité
Z-Average (d.nm): 109.3	**Pic:**	122.2	100.0



Tampon phosphate contenant KCl (1,17%) pour la préparation de la fraction cytosolique

KH_2PO_4 (0.1M)..... 1.35g
Eau distillée..... 100ml
KCl..... 1.17g
pH 7.4

Préparation du milieu réactionnel pour le dosage de la SOD

Cyanide de sodium (10^{-2}).....1ml
Solution du NBT ($1,76 \times 10^{-4}$M)..... 0.1ml
EDTA (66×10^{-3} M)..... 1ml
Riboflavine (2×10^{-6} M)..... 0.1ml
Tampon phosphate Na_2HPO_4 (0.1M).....QSP 10 ml
pH 7.8

Préparation du Boin alcoolique (Dubosq Brasil)

Acide picrique 1g
Acide acétique.....15ml
Formol pur.....60ml
Alcool 80°.....150ml

Colorant Eosine y (alcoolique) :1,5 l

Eosine y, solution aqueuse à 3% (3g/l).....1000ml
Alcool éthylique à 95% (+ 5ml d'eau distillée).....125ml
Eau distillée 375ml
Acide acétique glacial.....2 gouttes

ملخص :

الدكسوروبيسين المغلفة داخل الليبوزومات والمسوقة تحت اسم Caelyx® وضعت من اجل الحد من التسمم الكلوي الناتج عن شكلها العادي. الهدف من دراستنا هو المساهمة في تقييم تأثير التسمم الكلوي لهذه التركيبة الجديدة للدواء وذلك نظرا لقلة الدراسات في هذا المجال،عن طريق تحديد قدرة تصفية الكلى لمادة الكرياتينين من جهة و من جهة أخرى تحديد متغيرات التوتر الاكسدي (دي الدهيد مالونيك، الجلوتاثيون، السوبر اكسيد ديسميوتيز، الكاتاليز و الجلوتاتيون س ترونسفيراز):

الدكسوروبيسين المغلفة أبدت سميّة اقل مقارنة بشكلها العادي من خلال حقنها الوريدي و بجرعة تساوي 10 مغ/ كغ.

قدرة تصفية الكلى لمادة الكرياتينين(0.55 مل/ د مقابل 0.64 مل/ د عند الشاهد) و قيم دي الدهيد مالونيك، الجلزتاثيون وحتى قيم النشاط الاتزيمي للسوبر اكسيد ديسميوتيز، الكاتاليز و الجلوتاثيون س ترونسفيراز كانت قريبة من قيم الشاهد.

هذه النتائج تؤكد فرضية وجود انخفاض أيضي للشكل المغلف مع تقليل نسبة الجذور الحرة على مستوى الخلايا الكلوية.

الكلمات المفتاحية:الدكسوروبيسين، التسمم النفروني، الدكسوروبيسين المغلفة، الجذور الحرة الأكسوجينية.

Résumé :

Pour limiter la néphrotoxicité de la forme libre, la doxorubicine a été récemment encapsulée dans des liposomes et commercialisée sous le nom de Caelyx®. Cependant, l'évaluation de son incidence sur le rein n'a fait l'objet qu'à très peu de travaux. Ainsi, l'objectif de notre étude est une contribution à l'évaluation des effets néphrotoxiques de cette nouvelle forme pharmaceutique par la détermination de la clairance de créatinine et des paramètres de stress (MDA, GSH, SOD, CAT et GST). A la même dose de 10 mg/kg/IV, la doxorubicine encapsulée semble être beaucoup moins néphrotoxique que la forme libre. La clairance est conservée (0.55 ml/min contre 0.64 ml/min pour le témoin) et les valeurs du MDA, GSH et même celles des activités SOD, CAT et GST sont proches des valeurs des témoins. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une diminution de la métabolisation de la forme encapsulée et la réduction des radicaux libres au niveau des cellules rénales.

Mots clés : doxorubicine, néphrotoxicité, doxorubicine liposomale, radicaux libres oxygénés.

Summary:

To reduce the nephrotoxicity of the free form of doxorubicin, it has recently been encapsulated in liposomes and marketed under the name of Caelyx®. However, the evaluation of its impact on the kidney has been known only very few studies. Thus, the aim of our study is a contribution to the assessment of nephrotoxic effects of this new pharmaceutical form by the determination of creatinine clearance and stress parameters (MDA, GSH, SOD, CAT and GST). At the same dose of 10 mg / kg/IV, doxorubicin encapsulated seems to be much less nephrotoxic than the free form. The clearance is maintained (0.55 ml / min against 0.64 ml / min for the control) and the values of MDA, GSH and even those activities SOD, CAT and GST are close to control values. These results support the hypothesis of a decrease in the metabolism of the encapsulated form and the reduction of free radicals in kidney cells.

Key words: doxorubicin, nephrotoxicity, liposomal doxorubicin, reactive oxygen species.