



HAL
open science

Rôle des complexes de gadolinium dans le mécanisme de la fibrose systémique néphrogénique

Nathalie Fretellier

► To cite this version:

Nathalie Fretellier. Rôle des complexes de gadolinium dans le mécanisme de la fibrose systémique néphrogénique. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05P609 . tel-00843108

HAL Id: tel-00843108

<https://theses.hal.science/tel-00843108v1>

Submitted on 10 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université PARIS V – RENE DESCARTES
Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Environnement

THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES
Toxicologie

Présentée et soutenue par
Nathalie FRETILLIER

19 Juin 2013

**Rôle des complexes de gadolinium dans le mécanisme
de la fibrose systémique néphrogénique**

Directeurs de thèse :

Jean-Marc IDEE (Guerbet)
France MASSICOT (Laboratoire Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire)

Préparée, en collaboration, avec
Laboratoire GUERBET, *Division Recherche, Aulnay-sous-Bois*
Laboratoire de Chimie et de Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Paris

Membres du jury :

Mme le Pr. **Camille FRANCES**, *Rapporteur*
Mr le Pr. **Robert MULLER**, *Rapporteur*
Mr le Pr. **Gilbert DERAY**, *Examineur*
Mr le Dr. **Olivier CLEMENT**, *Examineur*
Mr le Pr. **Olivier LAPREVOTE**, *Examineur*
Mme le Dr. **France MASSICOT**, *Directeur de thèse*
Mr le Dr. **Jean-Marc IDEE**, *Directeur de thèse*

REMERCIEMENTS

C'est avec une grande joie qu'ai débuté cette thèse, et, aujourd'hui, c'est avec un léger pincement au cœur que j'en arrive à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces années de travail. Ainsi, une page importante de ma vie se tourne.

Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragée et soutenue durant ces années et bien évidemment à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration et à la réalisation de ce travail. Je voudrais leur adresser ces quelques mots afin de les remercier...

Tout d'abord, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon Directeur de thèse au sein du laboratoire Guerbet, le Docteur Jean-Marc Idée. Je ne saurai comment te remercier pour m'avoir fait confiance et ainsi permis de réaliser cette thèse CIFRE, mais aussi, pour m'avoir conseillée, orientée et soutenue durant toutes ces années. Merci pour tes précieux conseils et pour m'avoir transmis tes nombreuses connaissances et m'avoir fait partager ta passion de la Recherche. Merci de m'avoir permis de valoriser mon travail. Tu as été le directeur de thèse dont rêve tout doctorant, de par ta disponibilité et tes grandes qualités humaines, associées à ton sens scientifique aiguisé ! Merci également pour ton humour et pour nous avoir fait partager tes passions non professionnelles ! Et bien, évidemment, ce n'est pas terminé car comme tu le dis : « *la lutte continue* » !

Je remercie également vivement ma directrice de thèse au sein du laboratoire de Toxicologie, le Docteur France Massicot. Un très grand merci pour avoir accepté d'encadrer cette thèse ! Merci aussi pour la confiance que vous m'avez accordée dès le début, et pour vos conseils. Merci de m'avoir laissé la liberté nécessaire à l'accomplissement de ces travaux. Je vous remercie aussi de votre aide et de vos judicieux conseils dans la relecture et la correction de la thèse.

Je remercie chaleureusement le Docteur Claire Corot, Directrice de la Recherche & Innovation au sein de Guerbet, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de sa Division. Merci de m'avoir toujours fait confiance et pour vos précieux conseils sur le manuscrit.

J'adresse ma profonde gratitude au rapporteur, le Professeur Camille Francès, Responsable du Service de Dermatologie et d'Allergologie à l'Hôpital Tenon de Paris, pour me faire l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie vivement le Professeur Robert Muller, Professeur des Universités de Mons, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger et d'être rapporteur de ce travail de thèse.

Je remercie sincèrement le Professeur Olivier Laprévotte, Responsable du Laboratoire de Chimie et Toxicologie Analytique et Cellulaire, de m'avoir accueillie au sein son laboratoire et pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie chaleureusement le Professeur Gilbert Deray, Chef de Service de Néphrologie à l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière de Paris, pour l'intérêt qu'il a porté à nos travaux et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie vivement le Professeur Olivier Clément, Radiologue à l'Hôpital Européen Georges Pompidou de Paris, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de juger mon travail.

Je remercie également nos histopathologistes, les Docteurs Sylviane Guerret (Novotec), Nicolas Gadot (ANIPATH) et le Professeur Patrick Bruneval (HEGP) pour la réalisation des examens histologiques. Je tiens également à remercier, particulièrement, Patrick Bruneval de la confiance qu'il m'a témoignée en me permettant de donner des cours au sein du Master de Toxicologie de Paris.

Je souhaite remercier chaleureusement les différentes étudiantes qui ont effectué un stage au sein de notre équipe et qui ont participé grandement à ces travaux :

- Nejma Bouzian, « notre première stagiaire », qui a su montrer sa persévérance durant ce stage, malgré les quelques difficultés techniques que nous avons parfois eues. Merci pour ta gentillesse.
- Nadège Parmentier, qui m'a impressionnée par son sens de l'organisation, son autonomie et son habilité ! Merci pour ta bonne humeur quotidienne !
- Karine Debort, qui n'a pas réalisé son stage sur le sujet de la « fibrose systémique néphrogénique » mais qui m'a largement aidée durant les journées intenses de manip !
- Charlotte Gary, merci pour ton humour, ton énergie communicative et ta bonne humeur quotidienne ! Merci de t'être entièrement investie dans ton sujet !
- Mariem Salhi, « notre étudiante actuelle », pour son aide et son soutien.

Je tiens à remercier les Docteurs Caroline Robic, Olivier Rousseaux et Jean-Sébastien Raynaud pour leur aide et précieux conseils durant la rédaction du manuscrit. Un grand merci à eux ainsi qu'aux Docteurs Marc Port, Eric Lancelot, Sébastien Ballet, Philippe Robert, Anne Dencausse, Sarah Catoen, Olivier Fougère, Walter Gonzalez, Cécile Factor, Christelle Medina et Gaëlle Louin, pour les discussions enrichissantes que nous avons partagées !

Je tiens à remercier vivement tous mes collègues de l'équipe « BIO-IMEX », Miguel Soares, Robin Santus, Xavier Violas, Elisabeth Vaudon, Marjorie Lemaître, Véronique Vives, Martine

NainDitDucret et aux différents stagiaires pour leur accueil, leur bonne humeur, leur disponibilité, leur aide ponctuelle et pour m'avoir fait rire durant toutes ces années. Merci aussi pour ces délicieux repas que nous avons partagés et pour les nombreux pots qui ont satisfait ma gourmandise !

Et je souhaiterais tout particulièrement adresser mes remerciements à ma complice bretonne, Claire Hollenbeck, pour m'avoir formée à mon arrivée chez Guerbet, pour son aide, ses conseils, pour son précieux soutien à toute épreuve et pour notre belle amitié ! Je pense aussi à nos soirées fest-noz, qui m'ont permis de m'évader :-)

Je souhaite également remercier vivement Annick Legros, Jean-Philippe Roquecave et Simon Bourgery pour leur aide et pour avoir grandement pris soin des animaux lors de toutes nos études.

Je souhaite aussi remercier toute l'équipe du Pôle Discovery, pour leur accueil et leur aide. En particulier, je souhaite exprimer ma reconnaissance à Gaëlle Jestin-Mayer, Claire Wallon, Nicolas Poveda, Nathalie Poteau et Cécile Factor pour les très nombreux dosages de gadolinium et les études de spectrométrie de masse ! Je remercie vivement Jean-François Mayer, Jean-Michel Fabicki et Christelle Medina pour la synthèse chimique de nombreux produits !

Je souhaite également remercier Xavier Violas et Marie-Christine De Goltstein pour m'avoir initiée aux mesures et aux différentes interprétations de la relaxivité.

Je souhaite aussi remercier toute l'équipe de la Documentation, que j'ai énormément sollicitée pour obtenir les publications et, sans qui je n'aurais pas pu effectuer ce travail !

Un grand merci également au Docteur André Diai, pour les nombreux dosages de créatinine.

Mille mercis à nos assistantes, Annie Michel, Hélène Poenaru et Alice Walter pour leur gentillesse et leur aide précieuse dans l'organisation des voyages, réunions et pour avoir effectué nos nombreuses commandes... Un grand merci également à Martine Radionoff pour sa gentillesse et son aide.

Thanks to Doctor Javaad Ayub for his kind helps.

D'une manière générale, je remercie tous les collaborateurs Guerbet pour leur accueil, leur gentillesse et leur disponibilité.

I would like to thank Professor Sameh Morcos, from University of Sheffield, for facilitating a platform to share my findings with a highly acclaimed audience at Sheffield. In addition, I am very appreciative of his scientific expertise provided throughout my work.

I would like to thank Professor Shawn Cowper, associate professor of Dermatology and of Pathology at the Yale School of Medicine, and Professor John Haylor, from the University of Sheffield, for the fruitful and constructive discussions we had together on the mechanism of NSF.

Je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Dominique Parent-Massin pour m'avoir initiée à la Toxicologie et qui m'a donné la passion de cette discipline !! Merci de m'avoir conseillée dans mon parcours !

En dehors du monde professionnel, de nombreuses personnes m'ont soutenue et épaulée durant toutes ces années, et sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Tout d'abord, un grand merci à ma famille, mes parents et ma sœur, pour leur amour, leur soutien moral et pour avoir cru en moi !

Je voudrais également remercier tous mes amis qui m'ont permis de m'évader et pour le réconfort qu'ils ont pu m'apporter !

En particulier, à ma « jumelle » de parcours, Anne-Sophie, pour toutes ces merveilleuses années de vie étudiante passées en ta compagnie ! Merci d'être toujours aussi présente aujourd'hui. Merci aussi pour ton soutien sans failles et tous tes précieux conseils qui m'ont énormément aidée... Tu as été un réel « coach » pour moi pendant cette période de rédaction !

A mes amies d'enfance, Clélia et Julie, pour leur amitié et leurs mots réconfortants...

Un grand merci également à Agnès, Sandrine, Cyril, Olivier et Stéphanie.

A Christophe, pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour et pour tes attentions au quotidien... Merci pour ton soutien à toutes épreuves malgré mes périodes de doutes et pour tes multiples encouragements !! Merci de me rendre si heureuse à tes côtés et pour nous, ce n'est qu'un début...

Enfin, je finirai ces remerciements par une citation de Marcel Proust :

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. »

Marcel Proust

RESUME

La **fibrose systémique néphrogénique** (FSN) est une maladie rare et relativement récente, observée uniquement chez des patients souffrant d'insuffisance rénale sévère ou terminale. Elle est liée à l'administration d'une certaine catégorie de complexes de gadolinium (CG), les CGs thermodynamiquement moins stables, utilisés comme produits de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique. L'hypothèse mécanistique la plus couramment citée concerne les effets **profibrosants du Gd³⁺ « libre »** après **dissociation *in vivo*** des CGs les moins stables mais il n'en existe pas de démonstration formelle. La physiopathologie de cette maladie reste mal connue, notamment par manque de modèles précliniques pertinents.

Les travaux de cette thèse répondent donc à la nécessité d'approfondir nos connaissances concernant les relations entre les propriétés physicochimiques des CGs (structure, stabilité) et le risque de toxicité chronique, afin de **mieux comprendre leur rôle dans le mécanisme de la FSN**.

Nous avons mis aux points plusieurs modèles **de FSN chez le Rat**. Nous avons aussi comparé les effets de toutes les catégories structurales des CGs sur ces modèles. Une **toxicité systémique importante** et la survenue de **lésions cutanées** macroscopiques et d'une **fibrose** du derme sont notées après administration de **gadodiamide** (un CG linéaire et ionique de faible stabilité), ce qui est cohérent avec le fait que la grande majorité des cas de FSN sont associés à cet agent. Nous avons aussi montré que cette toxicité dépend du **degré d'insuffisance rénale** et que l'**hyperphosphatémie** sensibilise les animaux aux effets profibrosants du gadodiamide. Nos données suggèrent donc que ces facteurs associés sont des facteurs de risque de la FSN.

Nous avons observé la **dissociation progressive *in vivo*** de deux CGs linéaires présentant une faible stabilité, le **gadodiamide** et l'**acide gadopentétique**, après administration chez le Rat insuffisant rénal, avec libération de Gd³⁺ sous forme libre et soluble. Les CGs **macrocycliques** sont restés **stables**. Nous avons confirmé cette stabilité sur du sérum de Rat et du sérum humain alors que le gadodiamide se dissocie *in vitro*. Nos données suggèrent aussi une interaction entre l'ion **Gd³⁺ dissocié** à partir du gadodiamide et les **protéines sériques**. Cette **libération de Gd³⁺** est accélérée en présence d'une forte concentration de **phosphate**.

Globalement, nos résultats suggèrent ainsi un **rôle causal du Gd³⁺ libre** dans les lésions cutanées observées chez les animaux insuffisants rénaux.

Enfin, nous avons observé l'**implication de la voie de signalisation canonique de TGFβ**, le marqueur clé de la fibrose, uniquement chez des rats ayant reçu le gadodiamide et dont l'insuffisance rénale est modérée.

Nos travaux sont donc en faveur de l'hypothèse mécanistique d'une **dissociation des CGs peu stables**.

Mots clés : Fibrose Systémique Néphrogénique, Gadolinium, Complexes de gadolinium, Dissociation, Relaxométrie, Fibrose, Insuffisance rénale

ABSTRACT

Nephrogenic systemic fibrosis (NSF) is a rare systemic fibrosing disorder which has been described in patients with severe or end stage renal failure. NSF is associated with prior administration of certain gadolinium complexes (GCs), used as magnetic resonance imaging contrast agents, particularly those which have the lowest thermodynamic stability. The most widely accepted hypothesis regarding the mechanism is based on **profibrotic effects of free Gd³⁺** following in **vivo dissociation** of the less stable GCs. Nevertheless, there is no conclusive evidence so far. The pathophysiology is not completely understood, especially due to the lack of relevant non-clinical models.

The purpose of our thesis was to investigate the relationship between physicochemical properties of GCs (molecular structure, thermodynamic stability) and the risk of chronic toxicity (especially fibrosis), in order **to enhance our understanding of their role in the mechanism of NSF.**

We have set-up various non-clinical models of **NSF in renally-impaired rats.** We also compared the effects of all categories of GCs on these models. A **high systemic toxicity**, associated with macroscopic **skin lesions** and dermal **fibrosis**, was observed after the administration of **gadodiamide** (a linear and nonionic GC with a low thermodynamic stability). Whereas more stable, macrocyclic GCs were well tolerated. These findings seem clinically-relevant because the vast majority of NSF cases are associated with gadodiamide. We also showed that systemic and skin toxicities depend on the **baseline renal function**, and that **hyperphosphataemia** sensitizes renally-impaired rats to the fibrotic effects of gadodiamide. Our data suggest that these factors are, actually, risk factors for NSF.

We observed **in vivo dissociation** of two linear GCs, gadodiamide and gadopentetic acid, with gradual release of soluble Gd³⁺, in renally-impaired rats. **Macrocyclic** agents remained **stable.** This observation was also confirmed both in rat and human serum by the relaxometry technique. Our results are also consistent with an interaction between **dissociated Gd³⁺** and **serum proteins.** We also demonstrated that elevated serum **phosphate** levels accelerates the release of Gd³⁺.

Taken all together, our results suggest a **causal role of dissociated Gd³⁺** in gadodiamide-induced skin lesions in renally-impaired rats.

Finally, we identified the involvement of the **canonical signaling pathway of TGFβ**, the central mediator of the fibrotic response, in gadodiamide-treated rats with a moderate renal failure.

Our work is consistent with a causal role of dissociated **Gd in the mechanism of NSF.**

Key words : Nephrogenic systemic fibrosis, gadolinium, gadolinium complexes, dissociation, relaxometry, fibrosis, renal failure

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
RESUME	6
ABSTRACT	7
ABRÉVIATIONS	12
INTRODUCTION GENERALE	15
PARTIE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	19
CHAPITRE 1 : LES MECANISMES GENERAUX DE LA FIBROSE.....	20
1.1 Introduction	20
1.2 Avant-propos – définitions.....	21
1.2.1 Fibroblastes	21
1.2.2 Myofibroblastes.....	23
1.2.3 La synthèse du collagène	24
1.2.4 La prolyl 4-hydroxylase	25
1.3 Les étapes de la fibrose.....	25
1.4 Rôle des différents acteurs.....	28
1.4.1 Dommages de la barrière épithéliale/endothéliale	28
1.4.1.1 Cellules endothéliales.....	28
1.4.1.2 Cellules épithéliales.....	28
1.4.2 Cytokines profibrosantes (TGF β , CTGF et PDGF)	29
1.4.2.1 TGF β 1	29
1.4.2.2 CTGF	36
1.4.2.3 PDGF.....	38
1.4.3 Recrutement des cellules inflammatoires	39
1.4.4 Autres acteurs de la fibrose	42
1.4.4.1 Interleukine-13 (IL-13).....	42
1.4.4.2 Angiotensine II.....	43
1.4.4.3 Klotho	43
1.4.4.4 Endothéline-1	43
1.4.4.5 P2X7	45
1.4.4.6 PPAR- γ	45
1.4.4.7 Early growth responses (Egr).....	48
1.4.4.8 PTEN	50
1.4.4.9 Nrf2	50
1.4.4.10 Wnt- β -caténine	51
1.4.4.11 Intégrines	52
1.4.4.12 Hypoxie.....	53
1.4.4.13 Fli1	53
1.4.4.14 Acide lysophosphatidique	55
1.4.4.15 Récepteurs de type Toll (TLRs)	56
1.4.5 Induction des espèces réactives de l’oxygène (ROS)	57
1.4.6 Activation des cellules synthétisant le collagène.....	58
1.4.6.1 La voie des cellules résidentes	59
1.4.6.2 La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	59
1.4.6.3 Les fibrocytes circulants	60
1.5 Stratégies anti-fibrosantes et cibles thérapeutiques	61
1.6 Conclusion.....	66
CHAPITRE 2 : LES COMPLEXES DE GADOLINIUM	67
2.1 Introduction	67

2.2 Principe de l'IRM.....	67
2.3 Utilisation d'un agent de contraste en IRM.....	72
2.4 Gadolinium et autres lanthanides.....	73
2.5 Mode d'action.....	74
2.6 Catégories structurales des complexes de gadolinium.....	76
2.7 Propriétés physicochimiques des complexes de gadolinium.....	80
2.7.1 Osmolalité.....	80
2.7.2 Viscosité.....	81
2.7.3 Relaxivité.....	81
2.8 Stabilités.....	83
2.8.1 Stabilité thermodynamique.....	83
2.8.2 Stabilité cinétique.....	85
2.8.3 Relation structure/stabilité.....	86
2.8.4 Transmétallation.....	87
2.9 Pharmacocinétique et distribution.....	88
2.10 Tolérance.....	89
CHAPITRE 3 : LA FIBROSE SYSTEMIQUE NEPHROGENIQUE.....	91
3.1 Introduction – Contexte.....	91
3.2 Caractéristiques cliniques :.....	91
3.2.1 Manifestations cutanées.....	91
3.2.2 Manifestations systémiques.....	92
3.2.3 Biologie.....	93
3.3 Diagnostic.....	94
3.3.1 Critères cliniques.....	95
3.3.2 Critères histopathologiques.....	95
3.3.3 Insuffisance rénale.....	98
3.3.4 Exposition à un ou des CGs.....	98
3.4 Diagnostics différentiels.....	98
3.4.1 Sclérodermie.....	99
3.4.2 Scléromyxœdème.....	100
3.4.3 Lipodermatosclérose.....	100
3.5 Pronostic.....	100
3.6 Traitements.....	101
3.6.1 Transplantation rénale.....	101
3.6.2 Plasmaphérèse.....	102
3.6.3 Photophérèse extracorporelle.....	102
3.6.4 Photothérapie (UVA thérapie).....	103
3.6.5 Imatinib (Glivec®).....	103
3.6.6 Autres traitements.....	105
3.7 Facteurs associés à la FSN.....	106
3.7.1 Les complexes de gadolinium.....	106
3.7.2 L'insuffisance rénale.....	111
3.7.2.1 Insuffisance rénale et dialyse.....	111
3.7.2.2 Insuffisance rénale et CGs :.....	114
3.7.1 L'hyperphosphatémie.....	116
3.7.2 Métabolisme du fer.....	116
3.7.2.1 Présence concomitante de gadolinium et de fer dans les organes de patients FSN.....	116
3.7.2.2 Interaction entre les CGs et le métabolisme du fer.....	117
3.7.3 Autres co-facteurs.....	118
3.8 Recommandations des autorités de santé.....	120
3.9 Prévalence et incidence : études cliniques.....	124
3.10 Hypothèses mécanistiques.....	125

3.11 Modèles précliniques	130
CHAPITRE 4 : OBJECTIFS DE LA THESE	132
PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS	133
CHAPITRE 5 : DISSOCIATION DES COMPLEXES DE GADOLINIUM	134
5.1 <i>Dissociation in vitro des complexes de gadolinium</i>	134
5.1.1 Introduction	134
5.1.2 Matériel et méthodes	135
5.1.3 Résultats	136
5.1.3.1 Suivi du R ₁ des CGs dans plasma de Rat à 37°C, mesurée par relaxométrie	136
5.1.3.2 Plasma de Rat versus sérum de Rat	137
5.1.3.3 Suivi du R ₁ dans le séronorm à 37°C, mesurée par relaxométrie	138
5.1.3.4 Ajustement des concentrations de cations et de phosphate du séronorm à celles mesurées dans le sérum de Rat	139
5.1.3.5 Suivi du R ₁ dans le sérum humain comparé au séronorm pendant 15 jours et à 37°C, par relaxométrie	140
5.1.3.6 Ultracentrifugation du plasma de Rat	141
5.1.4 Conclusion	142
5.2 <i>Dissociation in vivo des complexes de gadolinium (Article 1)</i>	144
5.2.1 Rationnelle	144
5.2.2 Résultats et discussion	155
CHAPITRE 6 : EFFETS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES DES COMPLEXES DE GADOLINIUM IN VIVO	157
6.1 <i>Modèle d'insuffisance rénale par néphrectomie des 5/6^e (Article 2)</i>	157
6.1.1 Rationnelle	157
6.1.2 Résultats et discussion	168
6.2 <i>Rôle de la phosphatémie (Article 3)</i>	170
6.2.1 Rationnelle	170
6.2.2 Résultats et discussion	183
6.3 <i>Modèle d'insuffisance rénale par ajout d'adénine dans l'alimentation</i>	185
6.3.1 Rôle du degré de l'insuffisance rénale et comparaison des CGs (Article 4)	185
6.3.1.1 Rationnelle	185
6.3.1.2 Résultats et discussion	199
6.3.2 Modèle d'insuffisance rénale sévère et stable	201
6.3.2.1 Introduction	201
6.3.2.2 Matériel et méthodes	201
6.3.2.3 Résultats	207
6.3.2.4 Conclusion	219
CHAPITRE 7 : APPROCHE PHARMACOLOGIQUE DE LA FIBROSE SYSTEMIQUE NEPHROGENIQUE	221
7.1 <i>Approche pharmacologique de la signalisation impliquée dans les effets du gadodiamide sur un modèle d'insuffisance rénale modérée (partie 1)</i>	221
7.1.1 Introduction	221
7.1.2 Matériel et méthodes	222
7.1.3 Résultats	226
7.1.3.1 Evolution pondérale	226
7.1.3.2 Score clinique	226
7.1.3.3 Histologie	228
7.1.3.4 Hématologie	232
7.1.3.5 Créatinine plasmatique	232
7.1.3.6 Concentration de Gd total tissulaire	233
7.2 <i>Approche pharmacologique de la signalisation impliquée dans les effets du gadodiamide sur un modèle d'insuffisance rénale chronique (partie 2)</i>	234
7.2.1 Introduction	234

7.2.2 Matériels et méthodes	234
7.2.3 Résultats	237
7.2.3.1 Evolution pondérale	237
7.2.3.2 Créatinine plasmatique	237
7.2.3.3 Score clinique	237
7.2.3.4 Histologie.....	239
7.2.3.5 Concentration de Gd total dans la peau.....	244
7.3 Conclusion.....	245
DISCUSSION GENERALE	247
7.4 Dissociation des complexes de gadolinium.....	248
7.5 Modèles in vivo de fibrose systémique néphrogénique	259
7.6 Implication de la voie de signalisation de TGF β dans la fibrose induite par le gadodiamide	269
7.7 Hypothèse de mécanisme de la fibrose systémique néphrogénique	272
CONCLUSION	276
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	278
ANNEXES.....	325
<i>Annexe 1 : Mesure du temps de relaxation longitudinal T_1 au relaxomètre.....</i>	<i>325</i>
<i>Annexe 2 : Score clinique</i>	<i>327</i>
LISTE DES FIGURES	331
LISTE DES TABLEAUX	337

ABRÉVIATIONS

15d-PGJ2	15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2
α -SMA	alpha smooth muscle actin
ACR	American college of radiology
ALK5	Activin receptor-like kinase 5
AMM	Autorisation de mise sur le marché
bGFG	Basic fibroblast growth factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BMPs	Bone morphogenetic proteins
c-Abl	Tyrosine kinase cytoplasmique d'Alberson
CBP	CREB-binding protein
CD	Cluster de différenciation
CE	Cellules endothéliales
CERJ	Centre d'élevage René Janvier
CDDO	2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid
CG	Complexe de gadolinium
CHMP	Comité des médicaments à usage humain
CKD-EPI	Chronic kidney disease epidemiology collaboration
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
Co-SMAD	Common-mediator SMAD
CTGF	Connective tissue growth factor
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DL ₅₀	Dose létale 50
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGF	Epidermal growth factor
Egr	Early gene response
EMA	European medicine agency
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ET-1	Endothéline 1
FAK	Focal adhesion kinase
FDA	Food and drug administration
FINEST	Fibrose Néphrogénique Systémique
Fli 1	Friend leukemia integration-1
FPI	Fibrose pulmonaire idiopathique
FSN	Fibrose systémique néphrogénique
FSP-1	Fibroblast secretory protein-1
GAGs	Glycosaminoglycanes

Gd	Gadolinium
GDFs	Growth and differentiation factors
HD	Hémodialyse
HEGP	Hôpital européen Georges Pompidou
HES	Hématoxyline éosine safran
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
IFN- γ	Interféron-gamma
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL	Interleukine
IRA	Insuffisance rénale aiguë
IRC	Insuffisance rénale chronique
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IV	Intraveineuse
JNK	JUN N-terminal Kinase
KDOQI	Kidney disease outcomes quality initiative
KO	Knock-out
LAP	Latency-associated peptide
LLC	Large latent complex
Ln	Lanthanides
LPA	Acide lysophosphatidique
LTBP	Latent TGF β -binding protein
LTGF	Latent-TGF β
M ϕ	Macrophages
MAP kinase	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemotactic protein
MDRD	Modification of diet in renal disease
MEC	Matrice extracellulaire
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMPs	Matrix metalloproteinases
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NF κ B	Nuclear factor-kappa B
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NS	Non significatif
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Produit de contraste iodé
PD	Dialyse péritonéale
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Pro-FINEST	Prospective-Fibrose Néphrogénique SysTémique

PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTH	Hormone parathyroïdienne
RCP	Résumé des caractéristiques du produit
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Reactive oxygen species
SAP	Sérum amyloïde P
SARA	SMAD anchor for receptor activation
SBE	SMAD-binding element
SD	Standard deviation
Shc	Src homology domain 2 containing
SLC	Small latent complex
SM	Spectrométrie de masse
SNC	Système nerveux central
SSc	Sclérodémie systémique
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF β	Transforming growth factor beta
TIBC	Total iron binding capacity
TIMPs	Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
TK	Tyrosine kinase
UV	Ultraviolets
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family member

INTRODUCTION GENERALE

L'imagerie médicale est certainement « l'une des plus grandes révolutions de l'histoire de la Médecine » (Cailloce et coll., 2011). Elle est apparue suite à la découverte, par hasard, des rayons X (nommés « X » car leur nature était inconnue) par le physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen en 1895. C'est alors le début de la radiographie. Depuis, l'imagerie médicale s'est imposée comme un des piliers de la Médecine moderne.

Le principe de **l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)** est beaucoup plus **récent** que celui de la radiographie par rayons X (elle date du début des années 1980). Elle est basée sur le principe de **la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**, c'est-à-dire sur la propriété de certains noyaux d'atomes (comme l'hydrogène) à posséder un moment magnétique de spin. Ce phénomène fut observé pour la première fois dans les années 1930 par le physicien américain, Isidor Isaac Rabi (Rabi et coll., 1938) (prix Nobel de Physique en 1944). Elle a ensuite été décrite en 1946, par Bloch à Stanford et Purcell à Harvard (Bloch, 1946 ; Purcell et coll., 1946) (prix Nobel de Physique en 1952). Ce n'est qu'en 1973 que le chimiste américain, Paul Lauterbur, obtint la première image en IRM (Lauterbur, 1973) (prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2003). Cette technique présente, notamment, l'avantage de ne pas être irradiante et est plus sensible que le scanner rayons X.

L'imagerie médicale a fortement progressé ces vingt dernières années et elle a permis d'améliorer significativement le diagnostic de façon non invasive, ainsi que de mieux comprendre le rôle et le fonctionnement de certains organes. L'imagerie médicale est incontournable pour l'établissement du diagnostic, l'évaluation de la sévérité de la pathologie, mais aussi pour le suivi de l'efficacité du traitement ou l'adaptation de la prise en charge thérapeutique du patient. La radiologie interventionnelle permet d'effectuer des interventions guidées par l'imagerie, une radiothérapie locale ou l'administration locale d'un médicament de façon contrôlée. Beaucoup d'espoirs reposent sur le concept de « théranostique », qui combine le diagnostic d'une pathologie (notamment par l'imagerie) et son traitement, afin de personnaliser la prise en charge des patients.

L'imagerie médicale est souvent associée à **l'administration d'agents de contraste** afin d'améliorer le contraste entre la zone d'intérêt et les tissus environnants. Par conséquent, ils permettent de mieux visualiser les structures anatomiques ou pathologiques et de mieux caractériser les lésions. Contrairement à l'imagerie par rayons X, dans laquelle les produits de contraste iodés (PCI) agissent directement sur le signal, les produits de contraste **paramagnétiques** à base de **gadolinium** (complexe de gadolinium ou **CG**, nommé également chélate de gadolinium) utilisés en IRM possèdent une **action indirecte**. En effet, ils agissent sur la **relaxation** des protons de l'eau présents dans les tissus. Ainsi, ce n'est pas le signal du produit de contraste lui-même qui est observé, mais son action sur les molécules d'eau qui

l'entourent. **Le gadolinium libre étant toxique**, il est administré sous forme **complexée à un ligand**, ce qui en améliore considérablement la tolérance.

La tolérance des produits de contraste est généralement excellente, mais certains effets indésirables peuvent parfois survenir (sensation de chaleur, hypersensibilité...), comme pour tout médicament.

La description clinique de la **fibrose systémique néphrogénique** (FSN) est relativement récente (Cowper et coll., 2000). Cette pathologie a bouleversé le monde de la Radiologie lorsque, il y a six ans, le lien de causalité avec l'administration d'un produit de contraste à base de gadolinium a été suggéré (Grobner, 2006). Les profils de tolérance des différents produits de contraste étaient alors bien connus et, celui des produits de contraste à base de gadolinium était généralement considéré comme meilleur que celui des PCI, utilisés pour l'imagerie par rayons X. En effet, ces derniers sont associés à un risque non négligeable de réactions d'hypersensibilité et peuvent aussi induire une néphropathie chez le patient insuffisant rénal. Par conséquent, les CGs ont longtemps été considérés comme une alternative intéressante aux PCI chez les patients à risque (en particulier ceux présentant une insuffisance rénale), nécessitant une imagerie au scanner (Amet et Deray, 2012). Il a même été suggéré qu'il s'agit d'une des classes de médicaments les plus sûres jamais développées (Caravan, 1999). La découverte de la FSN a amené les autorités de santé européennes, américaines, japonaises et de nombreux autres pays à établir des **recommandations** d'utilisation des CGs et à **la contre-indication de certains agents** chez les patients **insuffisants rénaux**. Elles ont ainsi reconnu que le risque de développer une FSN dépendait du degré de l'insuffisance rénale préexistante, mais aussi de la structure moléculaire du CG utilisé. En effet, la majorité des cas de FSN est associée à l'administration d'une certaine catégorie structurale, les CGs « linéaires ». La question, discutée depuis longtemps, de **l'importance de la stabilité thermodynamique** de ces complexes fut alors relancée. En effet, cette dernière diffère considérablement selon la catégorie structurale du CG. D'une manière générale, les CGs macrocycliques sont nettement plus stables que les linéaires et, les CGs ioniques plus stables que les non-ioniques (Idée et coll., 2006).

L'hypothèse d'une **décomplexation** (c'est-à-dire, d'une dissociation) *in vivo* des CGs les moins stables a été suggérée dans la littérature mais la nature dissociée (libre) ou complexée du gadolinium retrouvé dans les biopsies cutanées chez l'Animal ou de patients souffrant de FSN, reste débattue. En effet, les méthodes analytiques utilisées ne permettent pas de répondre clairement à cette question. Par conséquent, il nous est apparu nécessaire d'étudier la dissociation éventuelle *in vitro* et *in vivo* des CGs, dans la mesure où cela peut conditionner directement le mécanisme de la maladie. En effet, la toxicité aiguë du gadolinium (Gd^{3+}) est très bien connue, son rayon ionique étant très proche de celui de Ca^{2+} . De plus, des études *in vitro* ont montré un effet prolifératif du gadolinium « libre » sous forme soluble ($GdCl_3$) (Varani et coll., 2009) mais également du gadolinium « libre » sous forme insoluble ($GdPO_4$) (Li et coll., 2010) sur des fibroblastes en culture ainsi qu'un effet

prolifératif plus important dans le cas des CGs linéaires que dans celui des macrocycliques (Edward et coll., 2008 ; Varani et coll., 2009).

La **physiopathologie** de cette maladie reste **mal connue**, notamment par manque de modèles précliniques pertinents. Différents modèles, chez des animaux naïfs ou insuffisants rénaux, ont été utilisés dans la littérature (Grant et coll., 2009 ; Haylor et coll., 2010 ; Pietsch et coll., 2009a ; Sieber et coll., 2008a et 2008b). L'intérêt de ces modèles est considérable, mais ils présentent l'inconvénient d'être assez peu discriminants, permettant peu la différenciation des différentes catégories de CGs en termes d'effets clinique et histopathologique (sauf les CGs linéaires et non ioniques), et ne reflétant que médiocrement la réalité épidémiologique sur laquelle les autorités de santé se sont appuyées pour émettre leurs recommandations. De plus, ces modèles n'intègrent généralement pas d'autres facteurs cliniques associés à la survenue de la FSN, comme l'hyperphosphatémie suggérée suite à des études « cas-témoin » (Marckmann et coll., 2007 ; Prince et coll., 2008). Il nous a donc semblé opportun de mettre au point un nouveau modèle *in vivo* de FSN discriminant et cliniquement pertinent, permettant de comparer les différentes catégories de CGs et par conséquent, de mieux comprendre le mécanisme de cette pathologie rare mais très invalidante. Bien sûr, ce modèle a également pour objet le criblage préclinique de nouveaux CGs.

De plus, le **rôle des facteurs cliniques associés** reste mal compris, sauf celui de l'insuffisance rénale dont il est généralement admis qu'elle se traduit par une augmentation de l'exposition à la molécule, qui est excrétée par voie urinaire. Il est donc essentiel de mieux comprendre le rôle des autres facteurs associés, celui de l'hyperphosphatémie ou celui de la sidérémie, par exemple.

Les travaux de cette thèse répondent donc à la nécessité d'approfondir nos connaissances en matière de relation entre les **propriétés physicochimiques** des complexes de gadolinium (c'est-à-dire, leur structure moléculaire et leur stabilité thermodynamique, ces deux paramètres étant liés) et le **risque de toxicité** chronique, afin de mieux comprendre **leur rôle** dans le **mécanisme** de la fibrose systémique néphrogénique.

La première partie de cette thèse situe le sujet sur la base d'une **revue de la littérature**. Le chapitre 1 décrit le phénomène de fibrose. Le chapitre 2 vise à décrire les agents de contraste à base de gadolinium (complexes de gadolinium). Enfin, le chapitre 3 présente un état de l'art sur la fibrose systémique néphrogénique. Le chapitre 4 présente les objectifs de nos travaux de recherche.

La seconde partie de cette thèse détaille nos **travaux personnels**. La première partie (chapitre 5) étudie la possibilité d'une dissociation des complexes de gadolinium *in vitro* et *in vivo*. La seconde partie (chapitre 6) est dédiée à la mise au point de *modèles in vivo*

cliniquement pertinents et discriminants de fibrose systémique néphrogénique. Enfin, la troisième partie (chapitre 7) est consacrée à l'étude de la voie de signalisation du TGF β , un marqueur clé de la fibrose, dans la FSN par une approche pharmacologique.

PARTIE 1 : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 1 : LES MECANISMES GENERAUX DE LA FIBROSE

1.1 Introduction

La **fibrose** est un phénomène très **complexe**, faisant intervenir différentes étapes et de nombreux paramètres et médiateurs, qui peuvent différer selon le tissu impliqué.

La fibrose peut affecter différents tissus, notamment le rein, le foie, la peau, le cœur ou les poumons. Dans certains cas, la fibrose est systémique comme dans les sclérodermies (ou sclérose systémique, nommé SSc), une maladie auto-immune induisant une induration de la peau mais qui peut également impliquer d'autres organes. La fibrose systémique néphrogénique (FSN), sujet de notre thèse, est également une fibrose particulière, puisqu'elle présente un caractère **systémique**, même si les signes cutanés sont les premiers observés.

Le phénomène de fibrose peut être défini par une **augmentation du tissu conjonctif** associé ou non à une **augmentation de la cellularité** (fibroblastes), selon son stade (Wynn et Ramalingam, 2012). Elle est consécutive à une agression tissulaire, qu'elle soit chimique, physique, bactérienne, virale ou antigénique.

Dans des conditions physiologiques, les processus de production (fibrogenèse) et de dégradation (fibrolyse) de la matrice extracellulaire (MEC) sont en équilibre. Si le processus de réparation (et donc de cicatrisation) n'est pas régulé ou si l'agression est chronique, un déséquilibre apparaît entre la synthèse, le dépôt et la dégradation de la MEC, aboutissant au développement d'une fibrose, avec formation d'un dépôt de MEC. La fibrose peut remanier fortement la structure du tissu ou de l'organe, entraînant ainsi un important dysfonctionnement de l'organe (Wynn et Ramalingam, 2012).

La fibrose est la conséquence de nombreuses pathologies, très variées. C'est un processus dynamique. Elle peut également être associée à des cancers.

D'un point de vue macroscopique, le tissu fibreux est généralement de couleur blanchâtre, ferme ou dur, selon son degré d'évolution. L'organe peut être hypertrophié mais il est plus souvent atrophié. D'un point de vue microscopique, l'aspect des fibroses est très variable selon leur ancienneté, leur composition biochimique et leur topographie. Elle se définit comme **une augmentation de la trame conjonctive** d'un tissu.

Une fibrose « récente » est caractérisée par une fibrose ferme et « lâche », riche en MEC non fibrillaire (prédominance de mucopolysaccharides). Les fibres de collagène γ sont peu condensées et peu épaisses ; de nombreux fibroblastes et myofibroblastes sont présents ainsi que des éléments inflammatoires comme les leucocytes.

Une fibrose plus ancienne se traduit par une fibrose dure et dense, riches en fibres de collagène épaisses et condensées mais avec peu de cellules et moins de substance fondamentale hydrosoluble.

Les fibroses peuvent être mutilantes (en remplaçant le tissu normal et, donc, en détruisant son architecture) ou dites « systématisées » (dans ce cas, la fibrose reste limitée à la charpente conjonctive normale du tissu, dont l'architecture est respectée).

Nous définirons ci-dessous les principaux acteurs de la fibrose, en résumerons les principales étapes puis décrirons les mécanismes moléculaires et cellulaires qui aboutissent à la fibrose.

1.2 Avant-propos – définitions

1.2.1 Fibroblastes

Les **fibroblastes** sont des cellules **allongées et fusiformes** ou **étoilées** possédant de longs prolongements cytoplasmiques (**Figure 1**).

Les fibroblastes ont de **nombreuses fonctions**. Les plus importantes sont :

- la synthèse et la sécrétion de molécules structurales (collagènes, fibronectine) ou non (thrombospondines, ostéopontine) de la MEC (on estime que chaque cellule est capable de produire environ 3,5 millions de molécule de procollagène par jour) ;
- l'organisation et le remodelage de la MEC par la production de protéinases (synthèse des métalloprotéinases MMPs [« Matrix metalloproteinases »]) et de leurs inhibiteurs TIMPs [« Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases »]) ;
- la régulation du volume et de la pression de fluide interstitiel (McAnulty, 2007 ; Sorell et Caplan, 2009).

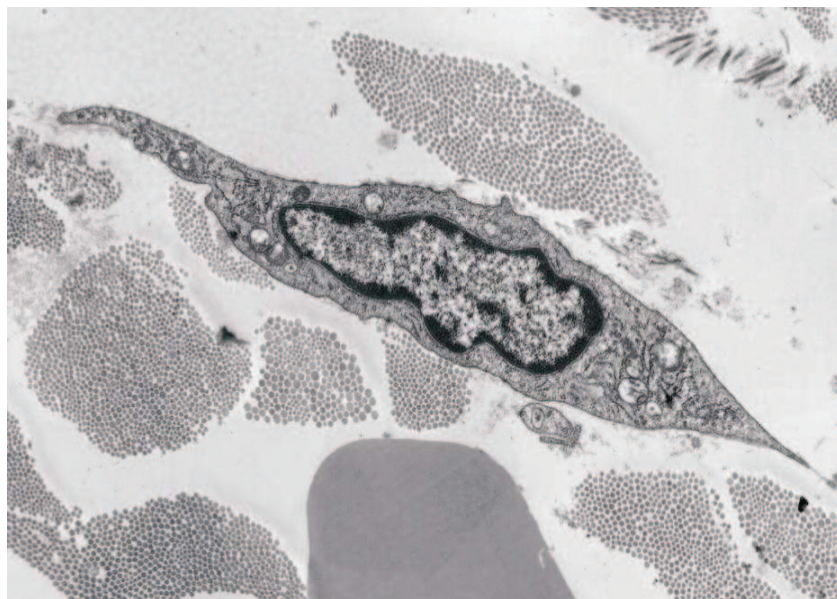


Figure 1 : Fibroblaste dermique de Rat, observé par microscopie électronique à transmission (x2600) (Haylor et coll., 2012)

Lors d'une agression, les fibroblastes migrent tout d'abord au sein de la zone lésée, sous l'influence de cytokines (telles que TGF β , « Transforming Growth Factor beta ») et de chimiokines (telles que MCP-1, « monocyte chemotactic protein ») libérées lors de la phase inflammatoire. Ensuite, ils vont proliférer et synthétiser les constituants de la MEC et pourront **se différencier en myofibroblastes** sous l'action de cytokines pro-fibrosantes telles que TGF β et CTGF (« Connective Tissue Growth Factor »). Par conséquent, suite à une agression, les fibroblastes et les myofibroblastes jouent un rôle majeur dans la réparation tissulaire et donc dans les phénomènes de fibrose (Desmouliere et coll., 2003).

Les fibroblastes expriment de nombreux marqueurs tels que la **vimentine** ou un autre marqueur cytoplasmique, le **FSP-1** (« Fibroblast Secretory Protein-1 », qui apparaît aussi dans la littérature comme « S100A4 »). Le marqueur de surface le plus intéressant (pour la cytométrie en flux par exemple) est **CD90** (qui équivaut à Thy-1) mais cet antigène n'est pas exprimé par tous les fibroblastes, selon l'organe considéré. Il convient de souligner que dans la peau, tous les fibroblastes sont Thy-1+ (CD90+) (Sorell et Caplan, 2009) (**Figure 2**).

Il existe une ambiguïté concernant la terminologie « fibrocytes » et « fibroblastes ». Il est, en effet, parfois difficile de les différencier. Certains auteurs nomment « fibrocytes » les fibroblastes inactifs. Cependant, d'après Bucala (Bucala et coll., 1994), les **fibrocytes** peuvent être définis comme des « cellules souches adultes », capables de se différencier en cellules fonctionnelles. Ces cellules peuvent circuler, contrairement aux fibroblastes et possèdent les caractéristiques à la fois de la **lignée hématopoïétique** (CD34, CD45) (puisqu'ils sont issus de la moelle osseuse) et **des fibroblastes** (collagène I) (**Figure 2**). Ils peuvent ensuite se différencier en fibroblastes ou en myofibroblastes en présence de différents facteurs. Les fibrocytes sécrètent de la MEC de manière constitutive, mais en faible quantité. Une fois différenciés en myofibroblastes, ils produisent de grandes quantités de collagène et de fibronectine.

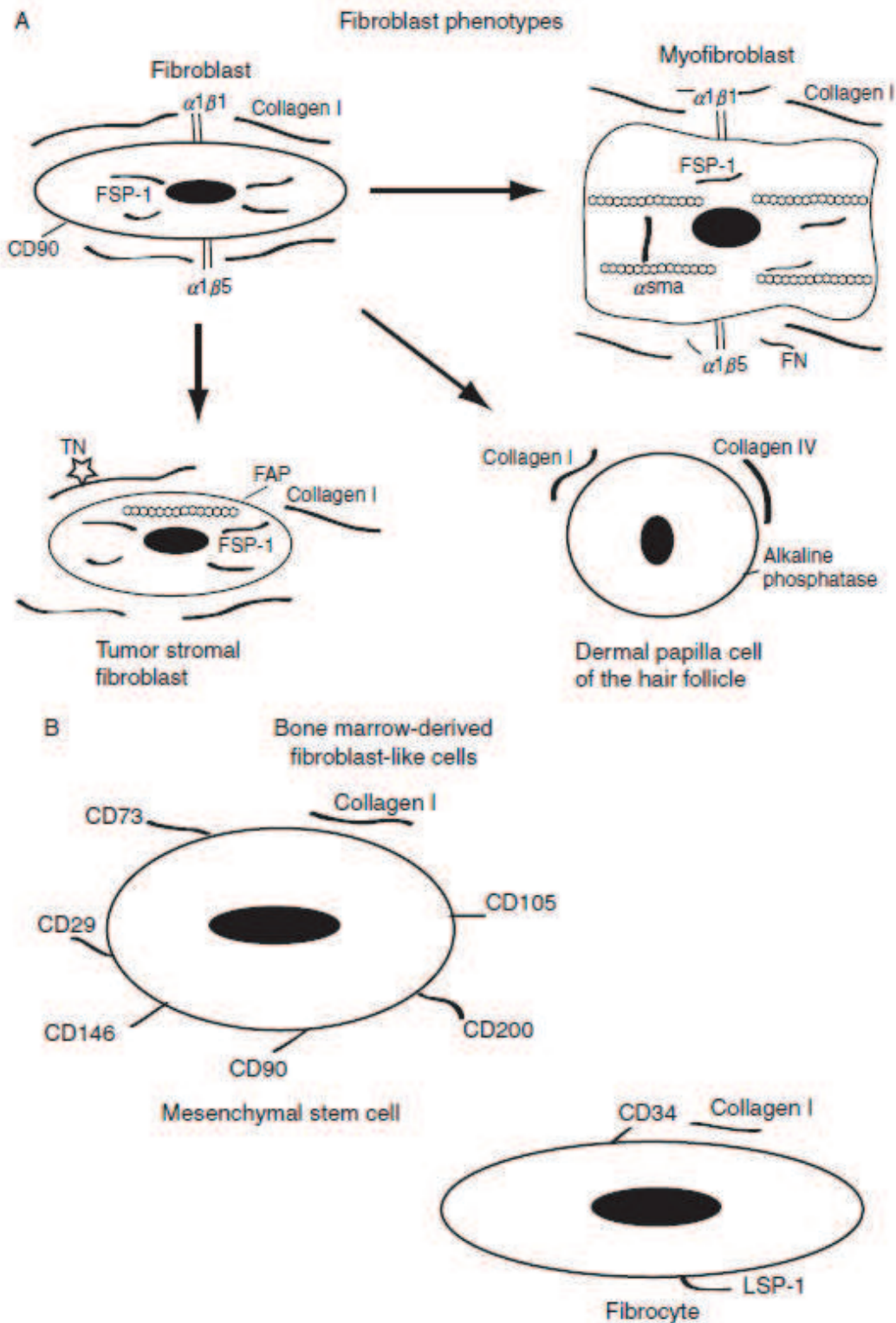


Figure 2 : Phénotype des fibroblastes, fibrocytes et myofibroblastes (Sorell et Caplan, 2009)

1.2.2 Myofibroblastes

Le **myofibroblaste** est un fibroblaste (différencié sous l'action de différents facteurs tels que $TGF\beta_1$) qui possède des **micro-filaments d'actine** (α -SMA pour « alpha-smooth muscle actin », un marqueur essentiel des cellules musculaires lisses) associés à des micro-filaments de myosine, ce qui lui permet de **se contracter**. Il peut synthétiser les composants de la MEC.

1.2.3 La matrice extracellulaire (MEC)

La MEC est constituée de glycosaminoglycanes (acide hyaluronique notamment), de composants fibreux (collagène, fibres élastiques) et de glycoprotéines de structure (fibronectine). Tous ces composants sont altérés lors des phénomènes de fibroses.

Par exemple, une concentration élevée d'acide hyaluronique est observée chez des patients souffrant de cirrhose hépatique ou de fibrose pulmonaire (Laurent et coll., 1996).

1.2.4 La synthèse du collagène

Le collagène est une protéine, de structure tri-hélicoïdale, sécrétée par les fibroblastes, qui est retrouvée généralement sous forme fibrillaire. Il est le composant le plus important de la MEC. A ce jour, 28 types de collagène ont été identifiés (Heino, 2007) ; ils peuvent être différenciés par la structure de leurs chaînes polypeptidiques. Néanmoins, le collagène de type I est le plus abondant dans l'organisme ; il est retrouvé dans la peau, les tendons ou les os. Dans notre travail de recherche, nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à ce dernier.

Le **collagène de type I** est composé de 2 chaînes alpha 1 et d'une chaîne alpha 2 polypeptidique, codées par les gènes COL1A1 et COL1A2. Après translation, les chaînes pro- α 1 et pro- α 2 entrent dans le réticulum endoplasmique où les résidus lysine et proline sont hydroxylés pour former l'hydroxyproline (voir le paragraphe 1.2.5 La prolyl 4-hydroxylase ci-dessous) et l'hydroxylysine. Les 3 chaînes s'associent pour former une triple hélice (**Figure 3**). Le procollagène est ensuite transporté à l'appareil de Golgi, où se produit une association latérale des chaînes en petits faisceaux qui sont ensuite excrétés dans le milieu extracellulaire par exocytose.

Dans le milieu extracellulaire, les procollagènes fibrillaires subissent une conversion protéolytique (coupure des propeptides N- et C-terminaux) et s'assemblent longitudinalement et transversalement pour former une fibrille de collagène. La fibrille est stabilisée par des liaisons intermoléculaires. Ces fibrilles se regroupent alors en fibres de collagène, qui vont ensuite se regrouper en faisceaux. Ces derniers apparaissent accolés les uns aux autres à l'examen histologique (Canty et Kadler, 2005 ; Pariente et coll., 2005).

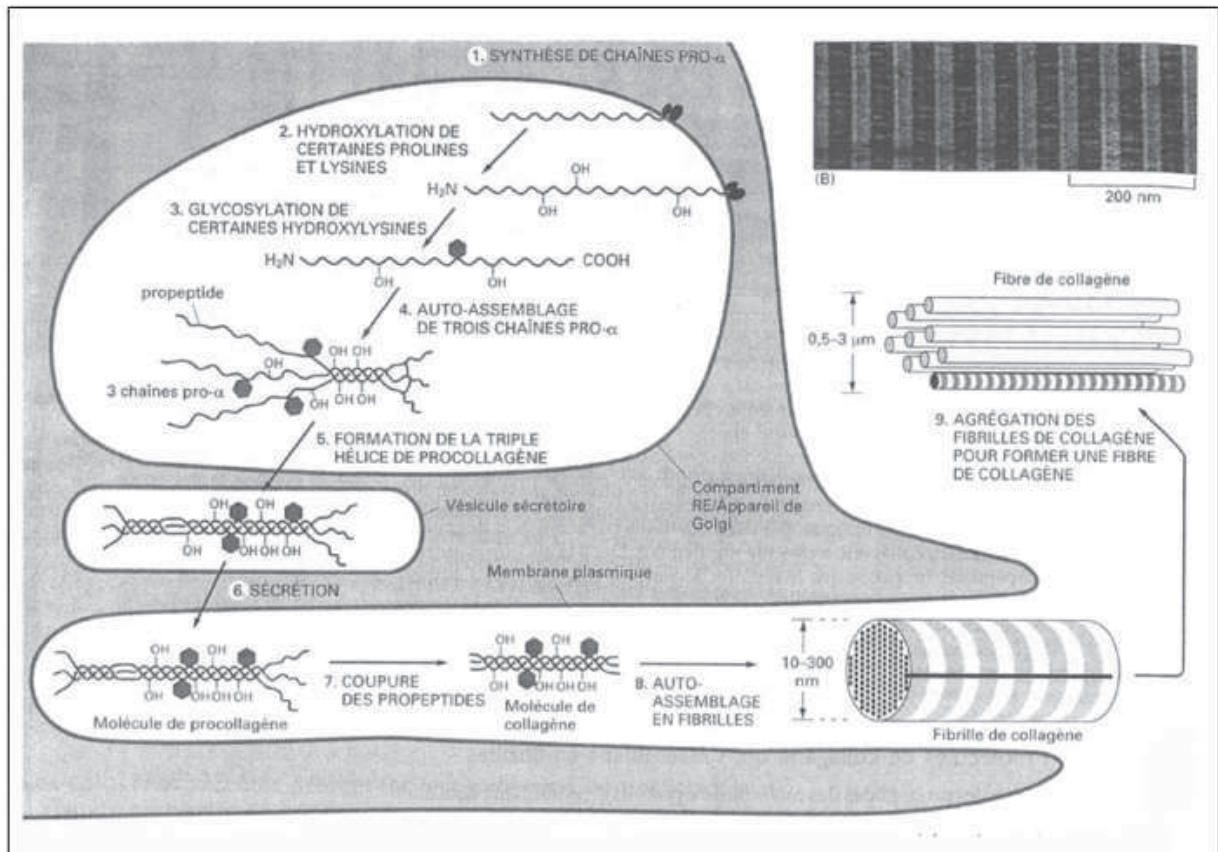


Figure 3 : Synthèse du collagène (Pariente et coll., 2005)

1.2.5 La prolyl 4-hydroxylase

La **prolyl 4-hydroxylase** (240 kDa) est une enzyme située sur la membrane interne du réticulum endoplasmique rugueux (RER) qui joue un rôle essentiel dans la synthèse de fibres de collagène. Elle contient 2 sous-unités α et 2 sous-unités β . Elle catalyse l'hydroxylation des résidus proline en séquences X-Pro-Gly des chaînes pro- α 1 et pro- α 2 du collagène. Elle facilite les échanges de ponts disulfures entre les protéines en cours de repliement. L'activité d'hydroxylation de la prolyl-4-hydroxylase est due à la sous-unité α , mais elle ne se manifeste que si l'enzyme est à l'état d'hétérotétramère. Les chaînes β sont responsables de l'entrée dans le RER alors que les chaînes α permettent la fixation de l'enzyme sur le collagène (Myllyharju et Kivirikko, 1999).

1.3 Les étapes de la fibrose

Les mécanismes de la fibrose restent **mal connus**. Néanmoins, les principaux acteurs impliqués dans les fibroses ont été identifiés. La fibrose se caractérise par une phase initiale d'inflammation suivie d'une phase de « maturation » (c'est-à-dire d'installation de la fibrose proprement dite avec formation de nouveaux tissus et remodelage du parenchyme pré-existant). Ils impliquent de **nombreux acteurs**, et le mécanisme général est schématisé ci-dessous (**Figure 4**, d'après Wynn, 2007) :

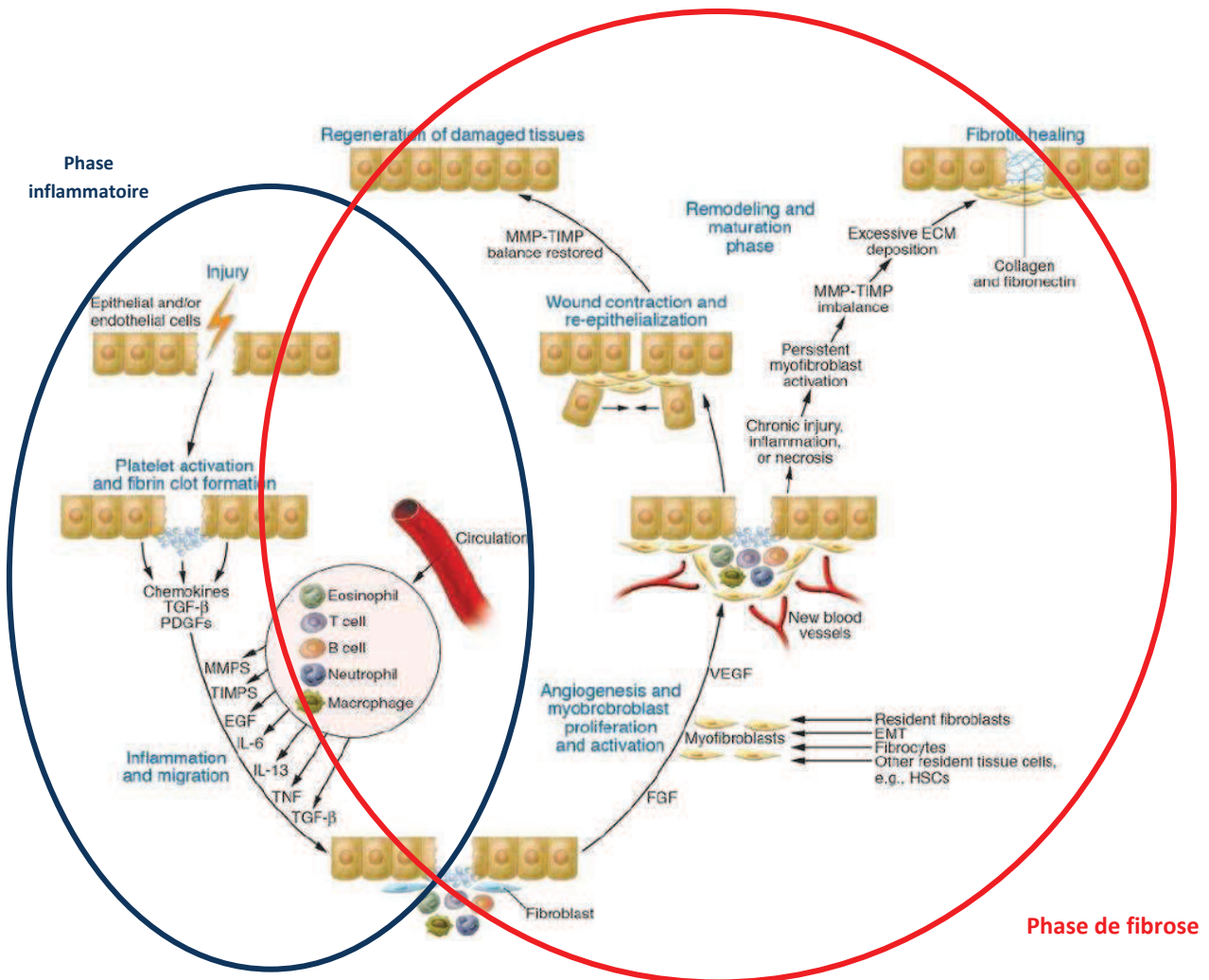


Figure 4 : Etapes de la fibrose (Wynn, 2007)

Suite à une agression tissulaire, les cellules épithéliales et/ou endothéliales sont endommagées et peuvent mourir. Par conséquent, elles libèrent différents médiateurs pro-inflammatoires, initiant ainsi la cascade de la coagulation qui aboutit à la **formation d'un caillot** de fibrine et d'une **MEC provisoire**. Les cellules épithéliales et/ou endothéliales sécrètent concomitamment des métalloprotéinases (MMPs), qui dégradent la membrane basale, et facilitent ainsi le recrutement des cellules inflammatoires au site de l'agression. En outre, les cellules épithéliales et/ou endothéliales sécrètent des facteurs de croissance, des **cytokines et des chimiokines**, qui stimulent la prolifération et le recrutement des leucocytes, des lymphocytes T (les lymphocytes T régulateurs ont des propriétés anti-fibrosantes et les lymphocytes T effecteurs sont pro-fibrosants) et des lymphocytes B. En dégranulant et en mourant, les neutrophiles (les cellules les plus abondantes dans la lésion, après extravasation) activent **les macrophages**. Lors de la phase inflammatoire initiale, ces cellules éliminent les débris cellulaires et les cellules mortes. Elles sécrètent également des cytokines (IL-13, TGFβ₁...) et des chimiokines qui permettent la **migration des fibroblastes** au site de l'agression, puis leur **différenciation** ultérieure en **myofibroblastes**. Ces derniers peuvent être issus des cellules mésenchymateuses résidentes, de la moelle osseuse

(fibrocytes) ou être la conséquence du phénomène dit de « transition épithélio-mésenchymateuse » (TEM), c'est-à-dire le processus biologique qui permet à une cellule épithéliale polarisée de subir de multiples changements biochimiques aboutissant à un phénotype de cellule mésenchymateuse incluant des propriétés migratoires et invasives, une résistance élevée à l'apoptose et enfin la capacité de synthétiser des éléments de la MEC (Kalluri et Weinberg, 2009) (voir la section 1.4.6.2 La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)) .

Les myofibroblastes vont ensuite **synthétiser les composants de la MEC** (collagènes, fibronectine) afin de remplacer la MEC provisoire.

Lors de la phase de maturation, les myofibroblastes activés, doués de propriétés contractiles, induisent la contraction de la plaie afin d'en rapprocher les berges, le cas échéant. Enfin, des nouveaux vaisseaux se forment, puis les cellules épithéliales et/ou endothéliales se multiplient et migrent pour réparer l'épithélium et l'endothélium.

Cependant, dans le cas d'une agression ou d'une inflammation chroniques, d'une infection ou d'une nécrose tissulaire, le processus normal de réparation est interrompu : les myofibroblastes restent activés et produisent les composants de la MEC en excès, conduisant ainsi au **processus de fibrose**.

Toutefois, l'hypothèse, selon laquelle l'inflammation chronique entraînerait la lésion tissulaire et par conséquent la fibrose, est désormais largement abandonnée en faveur d'hypothèses qui mettent l'accent sur la mort cellulaire comme principal moteur de ce processus (**Figure 5**). Par ailleurs, les cellules recrutées, les facteurs de croissance et médiateurs libérés au cours de la réponse inflammatoire jouent un rôle crucial dans la phase de réparation tissulaire (Herzog, 2012 ; Homer et coll., 2011). La fibrose serait donc un processus **dynamique** au cours duquel les événements se mêlent et s'auto-entretiennent.

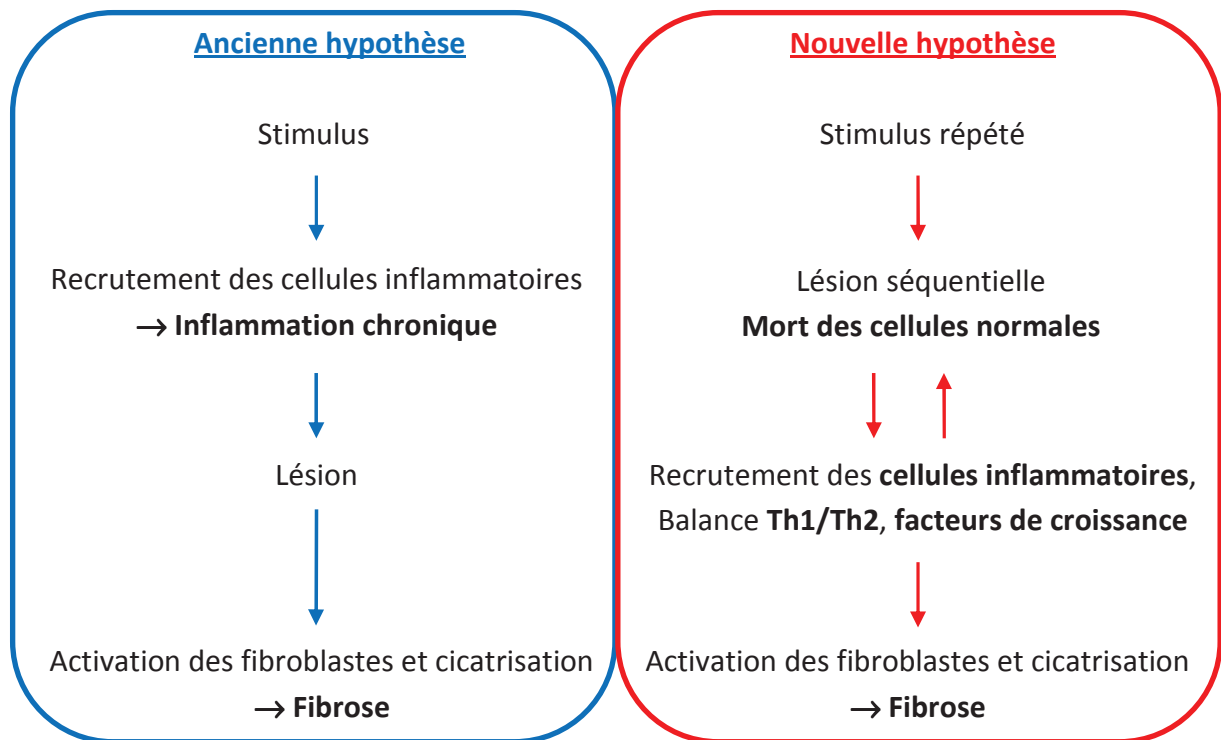


Figure 5 : Modèles de mécanisme de la fibrose (d'après Hergoz, 2012)

1.4 Rôle des différents acteurs

1.4.1 Dommages de la barrière épithéliale/endothéliale

1.4.1.1 Cellules endothéliales

L'atteinte vasculaire joue un rôle important dans la fibrogenèse (Kisseleva et Brenner, 2008). Les cellules endothéliales (CE) libèrent ou expriment des facteurs initiant l'**agrégation** et la **dégranulation des plaquettes**, le déclenchement de la **cascade de la coagulation**, et donc la formation d'un **caillot de fibrine** et d'une **matrice extracellulaire provisoire**.

Les CE sécrètent également des cytokines permettant le recrutement des cellules inflammatoires (leucocytes et macrophages). Les macrophages ne phagocytent pas seulement les produits de la dégradation et les débris cellulaires, mais ils produisent également des signaux pro-fibrosants et sécrètent également des facteurs chimiotactiques pour les CE. À leur tour, ces dernières prolifèrent et migrent à travers la membrane basale vers le centre de la lésion, facilitant ainsi le processus de cicatrisation.

En cas d'agression chronique, les CE sont impliquées dans le remodelage vasculaire. Les CE, en association avec les cellules progénitrices endothéliales circulantes, forment de **nouveaux vaisseaux sanguins** dans le tissu endommagé.

1.4.1.2 Cellules épithéliales

Les **cellules épithéliales** sont souvent situées à proximité des CE. Les blessures de l'endothélium et de la membrane basale affectent donc souvent aussi l'épithélium. Comme les CE, les cellules épithéliales endommagées contribuent à l'inflammation et la fibrogenèse.

En réponse à une agression, les cellules épithéliales sécrètent des **cytokines** (IL-4, IL-6, ostéopontine, endothéline-1, TNF α , « tumor necrosis factor alpha »), des **facteurs de croissance** et **chimiotactiques** (bFGF, « basic fibroblast growth factor », PDGF, « platelet-derived growth factor », TGF β) pour les cellules mononucléaires et les fibroblastes interstitiels (Kisseleva et Brenner, 2008). Elles peuvent entrer en apoptose ou bien se **transformer en fibroblastes** (cf. paragraphe 1.4.6.2 La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)).

La mort des myofibroblastes par apoptose, à l'issue de processus de réparation des tissus lésés, est un évènement normal. En cas de dysfonctionnement (résistance des myofibroblastes ou des cellules inflammatoires à l'apoptose), une inflammation chronique ou une fibrose peuvent survenir. Par ailleurs, une augmentation importante de l'apoptose des cellules épithéliales peut aussi induire une dérégulation de l'homéostasie et contribuer à la fibrose.

Les cellules épithéliales en apoptose sécrètent des cytokines qui permettent le recrutement et l'activation des monocytes en macrophages. Les corps apoptotiques sont ensuite phagocytés par ces macrophages activés. Ceux-ci vont ensuite libérer du TGF β_1 , permettant alors la prolifération des cellules synthétisant le collagène. Les myofibroblastes activés peuvent, à leur tour, produire du TGF β_1 et des espèces réactives de l'oxygène (ROS, « reactive oxygen species »), et ainsi faciliter l'apoptose des cellules épithéliales endommagées (Kisseleva et Brenner, 2008).

1.4.2 Cytokines profibrosantes (TGF β , CTGF et PDGF)

1.4.2.1 TGF β_1

1.4.2.1.1 La famille TGF β et rôles biologiques

La superfamille du TGF β est composée d'une trentaine de membres dont la famille de TGF β , les activines, les BMPs (« Bone Morphogenetic Proteins ») ainsi que d'autres facteurs tels que les GDFs (« Growth and Differentiation Factors ») (Akhurst et Hata, 2012).

Il existe 3 isoformes de la famille de TGF β (TGF β_1 à β_3), codées par des gènes différents. Elles sont très similaires d'un point de vue structural et leur expression dépend du tissu (Millan et coll., 1991) ou de la pathologie. Néanmoins, **l'isoforme 1** est la plus étudiée et est généralement considérée comme la plus pertinente dans la fibrose (Govinden et Bhoola 2003).

Le **TGF β_1** est une cytokine exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules et les tissus de nombreuses espèces, il est également pléiotrope : il régule en effet différents processus cellulaires dont la croissance, la migration cellulaire, l'invasion, la TEM ou encore l'immunosuppression (Akhurst et Hata, 2012). Le TGF β_1 permet également la **différenciation** des fibroblastes en myofibroblastes. Il régule le remodelage de la MEC (donc la cicatrisation

et la réparation tissulaire) et notamment l'expression des protéines de la MEC, dont le collagène. Il inhibe également la dégradation de la MEC car il augmente l'expression des **TIMPs** qui sont des inhibiteurs de la MMP-1, une métalloprotéinase qui présente une importante activité collagénolytique (Verrecchia et Mauviel, 2007) (**Figure 6**). $TGF\beta_1$ est souvent surexprimée dans de nombreuses pathologies, comme le cancer, l'inflammation et la fibrose. Le $TGF\beta$ est donc un acteur essentiel de la fibrose et cette cible thérapeutique fait l'objet de nombreux travaux (Akhurst et Hata, 2012).

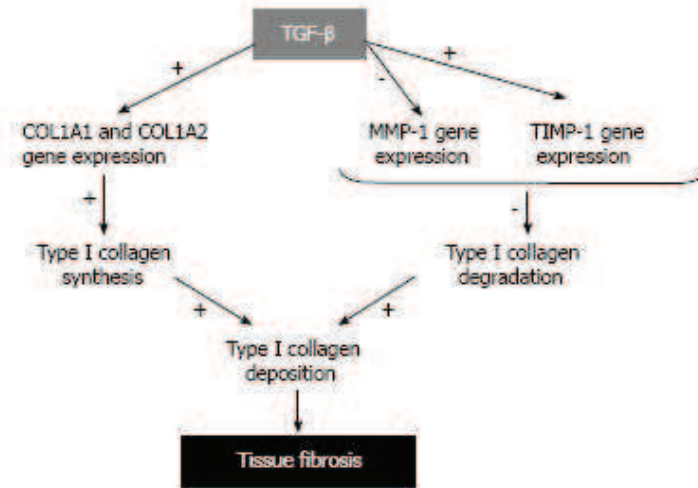
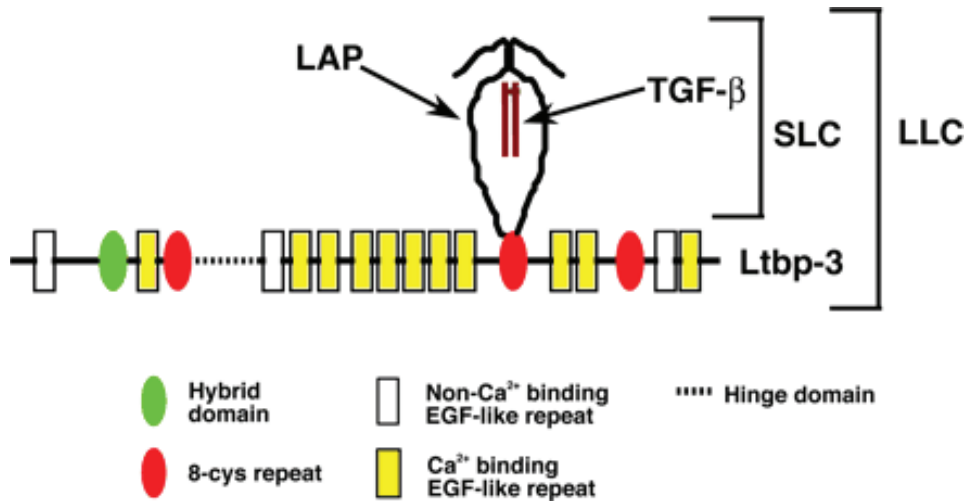


Figure 6 : Fonctions de $TGF\beta$ dans la fibrose (Verrecchia et Mauviel, 2007)

1.4.2.1.2 Synthèse et activation

Le $TGF\beta$ est une protéine synthétisée et sécrétée par de nombreux types cellulaires (macrophages, cellules tumorales, fibroblastes, plaquettes) sous une **pro-forme** (précurseur), le « **latent- $TGF\beta$** » (ou **LTGF β** , 390 à 414 acides aminés selon l'isoforme) (Figure 7). Le LTGF β est composé du domaine actif en C-terminal et d'un peptide signal de sécrétion, le **LAP** (« latency-associated peptide ») à l'extrémité N-terminale. Dès la fin de sa synthèse, une enzyme **clive** la liaison entre le $TGF\beta$ mature et le LAP. Néanmoins, le LAP reste associé au $TGF\beta$ mais de manière non covalente. Ce dimère forme un petit complexe latent nommé **SLC** (« small latent complex ») mais il peut également être lié de façon covalente à une protéine de liaison, **LTBP-1** (« latent $TGF\beta$ -binding protein 1 »), formant ainsi un gros complexe latent, le **LLC** (« large latent complex »). Les peptides LAP permettent la latence du complexe à l'état inactif alors que les LTBP permettent la fixation du $TGF\beta$ à la MEC et son stockage (Javelaud et Mauviel, 2004).

Par conséquent, le LTGF- β peut être sécrété sous forme d'un petit complexe latent nommé SLC (SLC = $TGF\beta$ actif + LAP) ou sous forme d'un gros complexe latent nommé LLC (avec donc, LLC = SLC + LTBP) (**Figure 7**).

Figure 7 : Structure du Latent TGF β (LTGF β) (Rifkin, 2005)

La **libération du TGF β actif** est secondaire à un processus protéolytique complexe (Roberts 1998). Son processus d'activation implique la libération du LLC à partir de la MEC, suivie par plusieurs protéolyses du LAP afin de libérer le TGF β actif vers son récepteur. Les métalloprotéinases MMP2 et MMP9 clivent le TGF β latent (Akhurst et Hata, 2012).

Une fois activé, le TGF β_1 induit une réponse cellulaire *via* **deux récepteurs** membranaires (T β RI et T β RII), à activité de sérine/thréonine kinase (De Caestecker, 2004). Cinq récepteurs de type II et sept de type I, également appelés « activin receptor-like kinases (ALKs), sont identifiés. Le ligand TGF β_1 actif se fixe, dans un premier temps, au récepteur **T β RII** (de type II), ce qui induit le recrutement et la phosphorylation du **T β RI** (également nommé ALK₅, de type I) et la formation du complexe **T β RII-T β RI** (Govinden et Bhoola, 2003). Ce complexe hétérotrimérique active alors la voie de signalisation du signal intracellulaire. La fixation de TGF β_1 à T β RI détermine la spécificité de la voie de signalisation (canonique ou non). Le troisième type de récepteur **T β RIII** (le bétaglycane ou l'endogline) est peu décrit. Il permet de faciliter la présentation du TGF β au récepteur T β RII, mais il ne possède pas d'activité de signalisation intrinsèque car il n'a pas d'activité kinase.

1.4.2.1.3 Voies de signalisation

Il existe des voies indépendantes de signalisation du TGF β : la voie canonique SMAD-dépendante et les voies non-canoniques, SMAD-indépendantes (**Figure 8**).

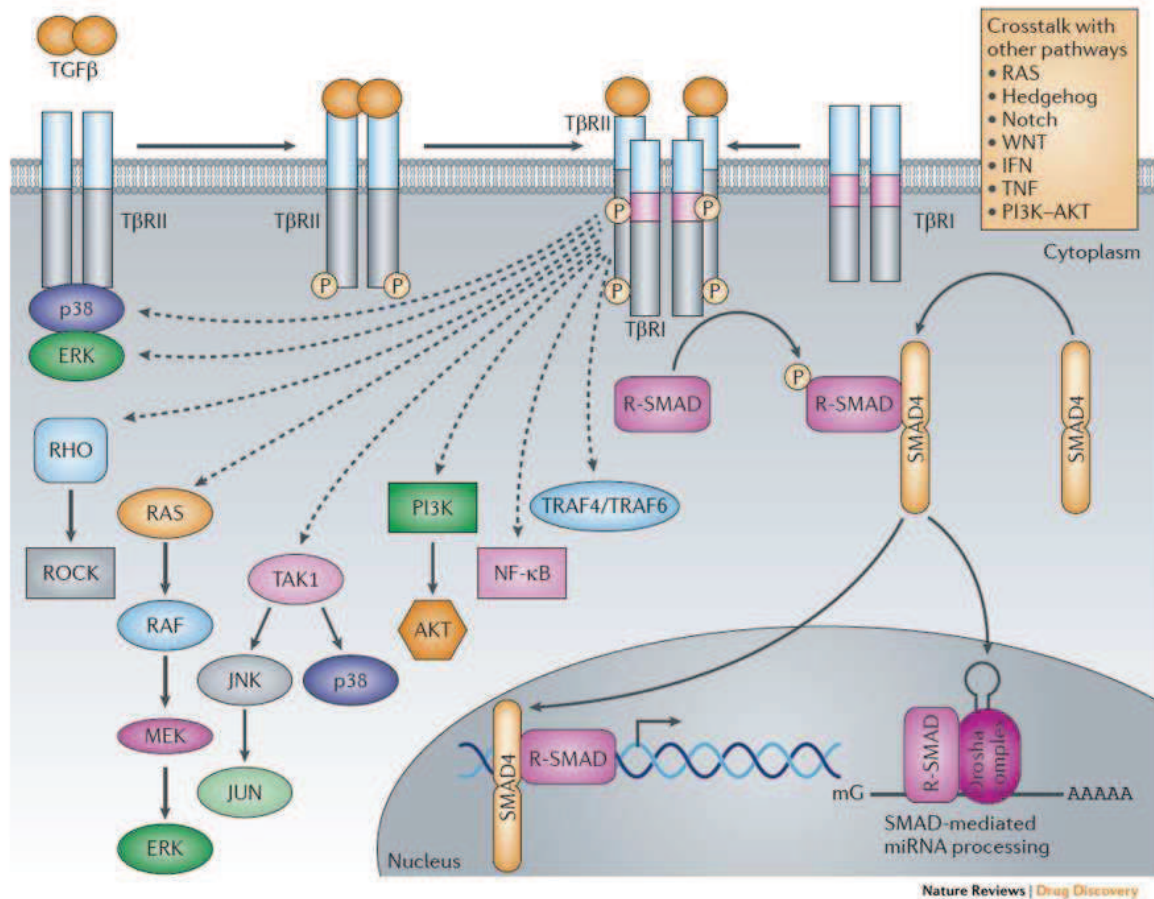


Figure 8 : Voies de signalisation de TGFβ (Akhurst et Hata, 2012)

- **La voie de signalisation canonique du TGFβ₁ (Figure 9) implique les facteurs de transcription SMADs.** Les protéines SMADs ont été identifiées pour la première fois chez la Drosophile et appelées, protéines « MAD ». Le terme "SMAD" fait référence aux protéines « MAD » de la Drosophile et leurs homologues « SMA » chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Massagué et coll., 2005).

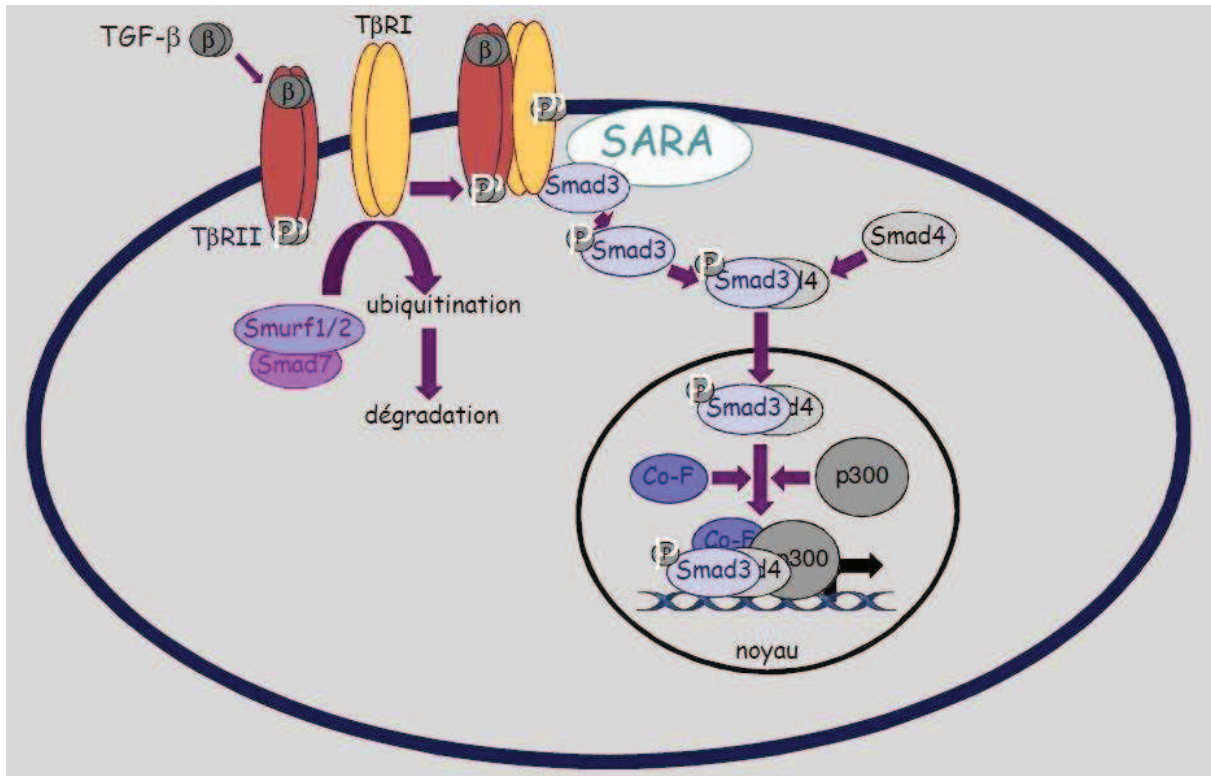


Figure 9 : Voie de signalisation de TGFβ SMAD-dépendante (Verrecchia, 2011)

L'activation du récepteur de type I (TβRI ou ALK5) induit la phosphorylation des « receptor-specific SMADs », **R-SMADs** (SMAD 2 ou SMAD 3 dans la fibrose), préalablement recrutés par différentes protéines auxiliaires dont **SARA** (« smad anchor for receptor activation »). Cette phosphorylation permet leur hétérodimérisation puis la formation d'un complexe transcriptionnel avec le **Co-SMAD**, « common-mediator SMAD » (SMAD 4), qui migre dans le noyau par transport actif. SMAD 4 peut être importé dans le noyau uniquement sous forme de complexe avec les R-SMADs, contrairement à SMAD 2 et SMAD 3, qui peuvent migrer dans le noyau indépendamment de SMAD 4 (Javelaud et Mauviel, 2004). Toutefois, SMAD 4 est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de SMAD 2/3 (Javelaud et Mauviel, 2004). Ce complexe R-SMAD/Co-SMAD s'associe à différents facteurs de transcription et recrute également des co-activateurs, tels que CBP (« CREB-binding Protein ») et le coactivateur transcriptionnel **p300**, afin d'induire la **transcription des gènes cibles** du TGFβ₁ (COL1A1 et COL1A2 par exemple) (Shi et Massagué, 2003). Une fois dans le noyau, ce complexe s'associe préférentiellement au **SBE** (« SMAD-binding element ») au niveau d'une séquence spécifique (Shi et Massagué, 2003).

Un nouveau rôle des R-SMADs a été identifié récemment. Ils pourraient être impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de la synthèse des microARN (miARN), de petits ARN (20 à 30 nucléotides de long) non codants (Hata et Davis, 2009).

Le rétrocontrôle de cette voie de signalisation SMAD-dépendante est principalement assuré par la dégradation des R-SMAD, par le système ubiquitine/protéasome, suite à l'action

inhibitrice des **I-SMAD** (SMAD 6 et SMAD 7) (Verrecchia et Mauviel, 2007). Les I-SMAD peuvent s'associer au T β RI activé, empêchant ainsi la phosphorylation des R-SMADs (SMAD 2 et SMAD 3) (Miyazono, 2000).

La cytokine pro-inflammatoire TNF α inhibe la voie des SMADs *via* l'activation de JNK (« JUN N-terminal kinase ») et de NF κ B (« nuclear factor-kappa B ») (Verrecchia et coll., 2003) (**Figure 10**).

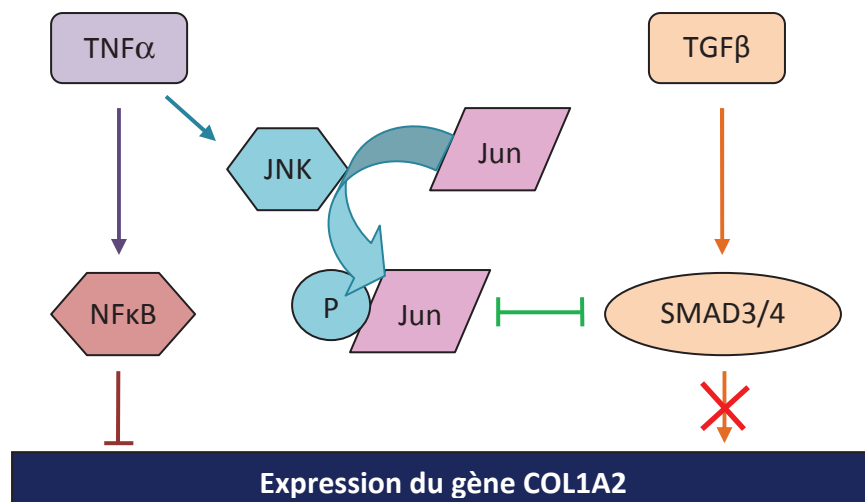


Figure 10 : Rôle inhibiteur de TNF α dans la régulation de l'expression de COL1A2 (D'après Verrecchia, 2011)

Il a également été montré qu'EGF (« Epidermal Growth Factor ») augmente SMAD 7, induisant par conséquent l'inhibition de la phosphorylation des R-SMADs (Nakao et coll., 1997).

- Par ailleurs, certaines voies de signalisation de TGF β **ne sont pas SMAD-dépendantes**. On parle alors de voies « **non-canoniques** » (**Figure 8**). Le complexe récepteur de TGF β activé transmet un signal par l'intermédiaire d'autres facteurs, tels que le TNF ou la voie des MAP kinase-p38 (« mitogen-activated protein kinase »), celle de « Rho-like GTPase », celle de PI3K (« phosphoinositide 3-kinase)/Akt (nommé également « protein kinase B »), ERK (« extracellular signal-regulated kinase), JNK ou encore celle du NF κ B (**Figure 8**) (Zhang, 2009 ; Akhurst et Hata, 2012).

Plus précisément, TGF β peut activer rapidement **PI3K** par l'intermédiaire de la phosphorylation d'**Akt** (Shin et coll., 2001) (**Figure 11**). La TEM induite par l'intermédiaire de la voie PI3K/Akt implique le régulateur de la synthèse des protéines, mTOR (« mammalian target of rapamycin »), et par la suite, la phosphorylation de la kinase S6 (Zhang, 2009). Akt est également capable d'inhiber la voie SMAD-dépendante car il interagit directement avec SMAD 3 en bloquant sa phosphorylation et sa localisation nucléaire (Conery et coll., 2004 ; Remy et coll., 2004).

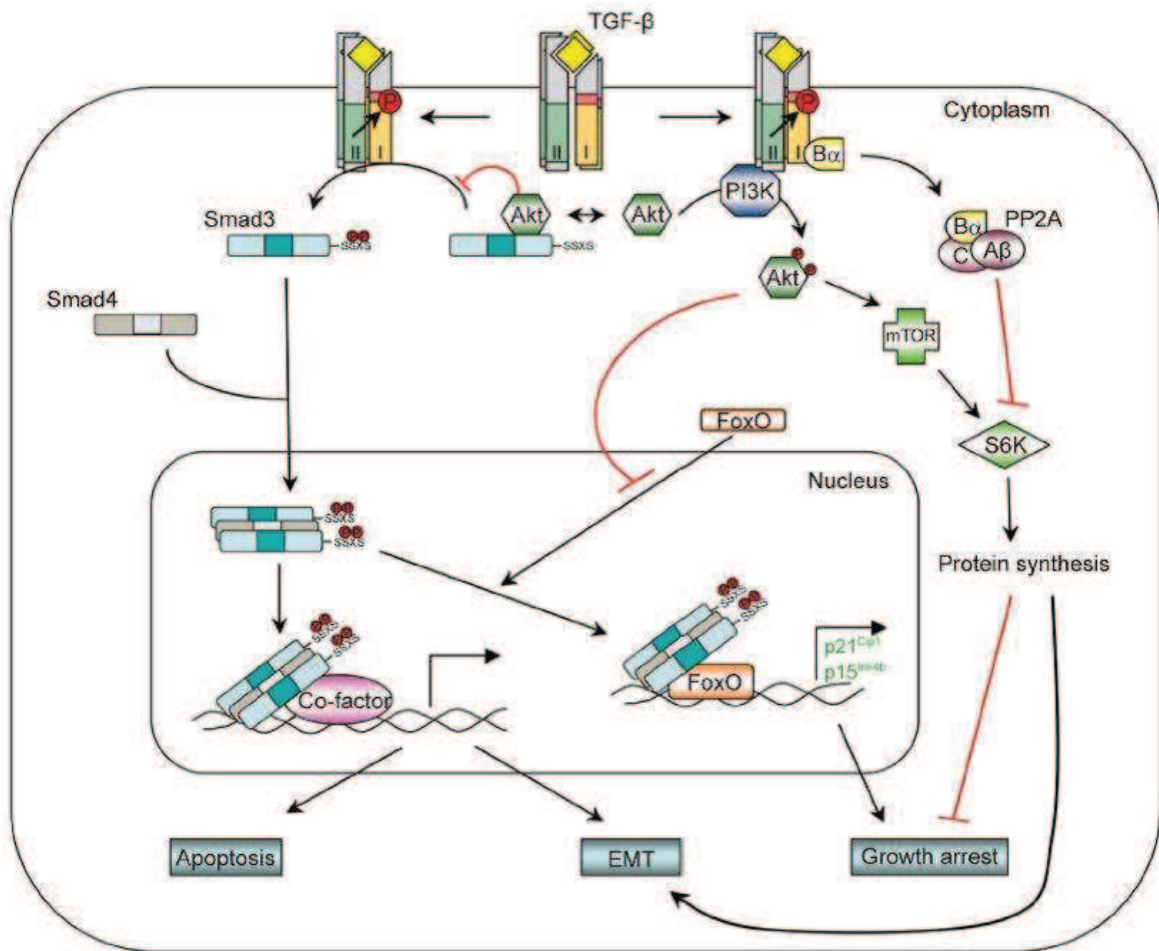


Figure 11 : Voie PI3K/AKT induite par TGFβ (Zhang, 2009)

TGF-β peut également induire la voie de signalisation **MEK/ERK (Figure 12)**. Il permet ainsi la phosphorylation des résidus de tyrosine sur les récepteurs de type I et de type II ou sur une protéine nommée Shc (« Src homology domain 2 containing »). Les tyrosines phosphorylées sont ensuite capables de recruter le complexe Grb2/SOS afin d'activer ERK, par l'intermédiaire de l'oncogène Ras, de Raf et de la cascade des MAPK (Zhang, 2009). ERK peut réguler la transcription de gènes cibles par l'intermédiaire de facteurs de transcription qui agissent concomitamment avec les SMADs pour induire la TEM. Néanmoins, ERK peut également inhiber les R-SMADs (Matsuura et coll., 2005).

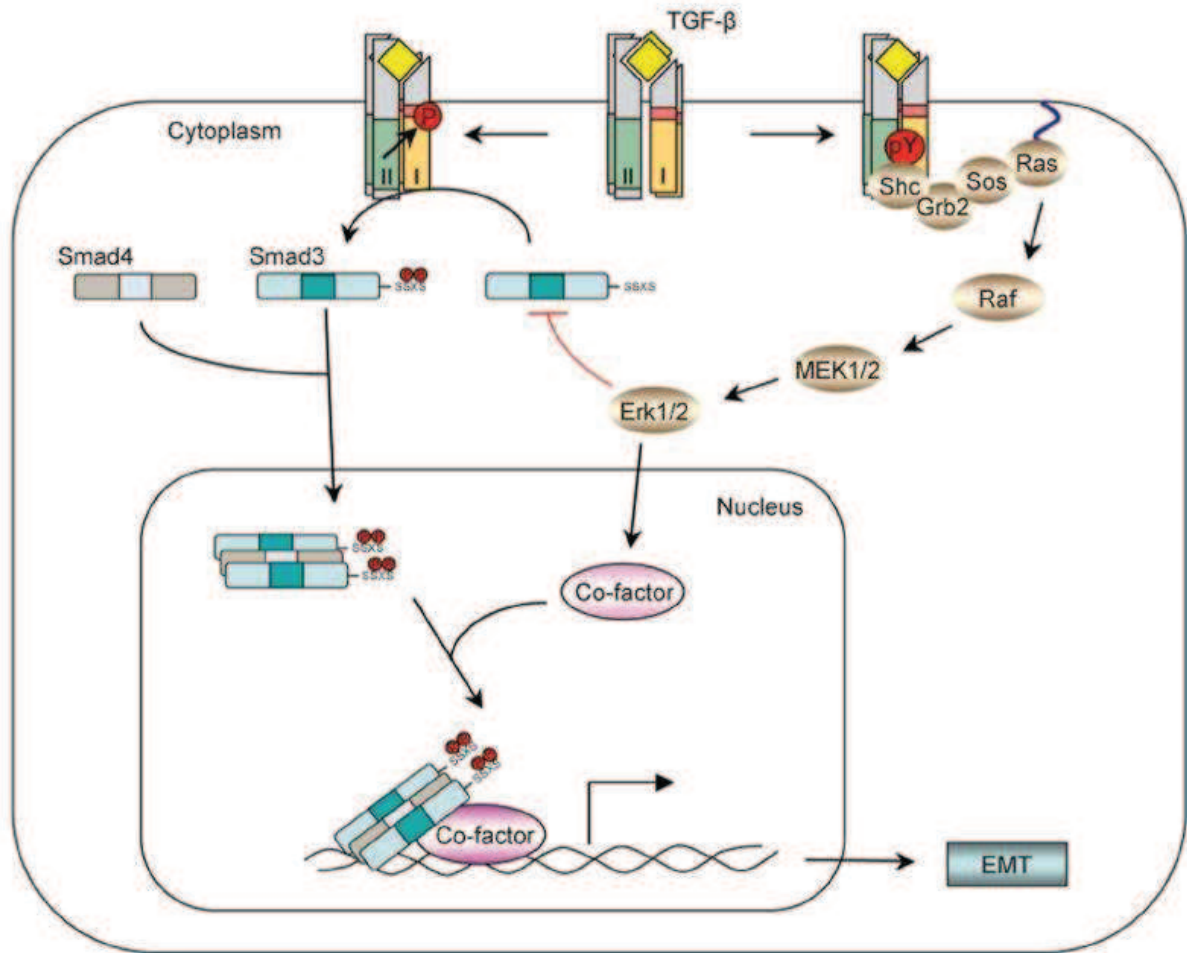


Figure 12 : Voie de signalisation MEK/ERK induite par TGFβ (Zhang, 2009)

TGF-β peut enfin induire l'activité la **tyrosine kinase cytoplasmique d'Alberson (c-Abl)** de la famille des Src, indépendamment de la voie des SMADs (Bhattacharyya et coll., 2009a ; Wilkes et Leof, 2006).

1.4.2.2 CTGF

Le **CTGF** (également nommé « **CCN2** ») est un autre facteur fibrosant au rôle essentiel, impliqué dans de nombreuses fibroses ou autres pathologies (Leask et coll., 2009 ; Lipson et coll., 2012). Le promoteur proximal de CTGF est induit par différents facteurs comme l'endothéline 1 (ET-1) ou le TGFβ mais également par l'hypoxie (Leask et coll., 2009).

CTGF intervient **en aval de TGFβ₁**, il est souvent considéré comme étant un cofacteur de TGFβ.

Deux mécanismes impliquent ce facteur :

- 1) premièrement, CTGF (grâce à son domaine contenant un motif du facteur de Von-Willebrand de type C) **augmente l'affinité de TGFβ₁ pour son récepteur TβRII**, favorisant ainsi la réponse et ses effets (Abreu et coll., 2002 ; Shi-Wen et coll., 2008).

2) ensuite, **CTGF bloque le rétrocontrôle négatif** de la voie du TGF β -SMAD dépendante: il inhibe la synthèse de la SMAD inhibitrice SMAD 7 (Wahab et coll., 2007) (**Figure 13**). Enfin, CTGF régule l'apoptose, la prolifération des fibroblastes, l'adhésion cellulaire, la chimiotaxie, et le dépôt de MEC (Perbal, 2004). Le récepteur spécifique du CTGF n'est pas connu. Cependant, il a été observé que le CTGF peut lier et activer différentes classes de récepteurs dont les intégrines par exemple ($\alpha\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, ou $\alpha_6\beta_1$) (Mason, 2009).

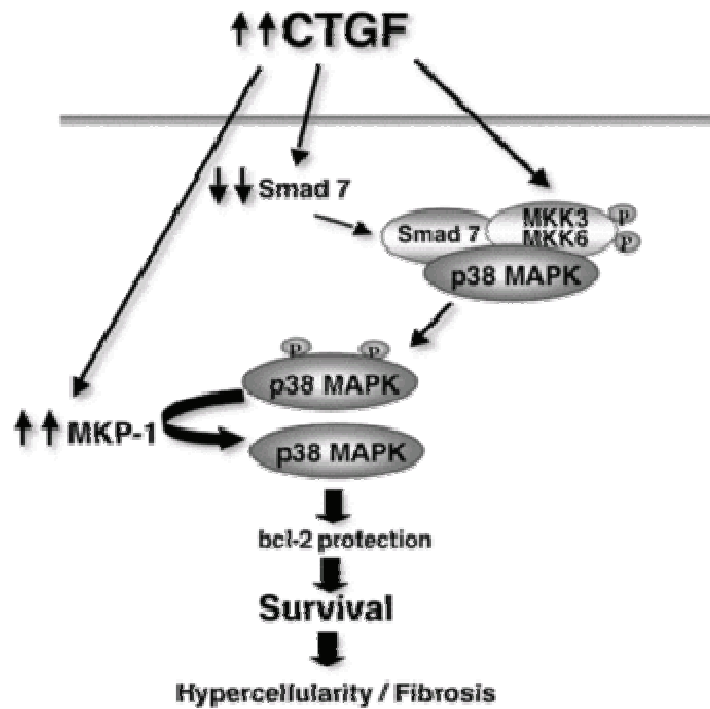


Figure 13 : Fonction inhibitrice par CTGF de SMAD 7 (Wahab et coll., 2007)

Dans de nombreuses fibroses, les concentrations plasmatiques de CTGF mesurées chez les patients sont corrélées avec la sévérité de la fibrose (**Tableau 1**). CTGF pourrait ainsi être un biomarqueur de certaines fibroses.

Tableau 1 : Maladies pour lesquelles les concentrations élevées de CTGF circulant (mesurées par ELISA) sont corrélées à la sévérité de la fibrose (Leask et coll., 2009).

Hepatic fibrosis in biliary atresia	(Tamatani et al. 1998)
Pulmonary fibrosis in scleroderma	(Sato et al. 2000)
diabetic nephropathy	(Gilbert et al. 2003)
proliferative vitreoretinopathy	(Hinton et al. 2002).
skin fibrosis in scleroderma	(Dziadzio et al. 2005)
Kidney allograft fibrosis	(Cheng et al 2006)
liver fibrosis	(Gressner et al. 2006)
chronic viral hepatitis	(Gressner et al. 2006)
Fibrotic carcinoid tumors	(Kidd et al 2007)
diabetic retinopathy	(Kuiper et al 2008)
End-stage renal disease	(Nguyen et al. 2006)
myocardial fibrosis	(Koitabashi et al. 2008)

Les souris KO (« knock-out ») pour CTGF meurent rapidement après la naissance (Ivkovic et coll., 2003) alors que la délétion de CTGF uniquement au niveau des fibroblastes, induit une résistance à la fibrose induite par la bléomycine chez la Souris (Liu et coll., 2011a). La surexpression de CTGF au niveau des fibroblastes, chez des souris transgéniques, induit une fibrose dans de multiples organes, sans implication de la voie canonique TGF β -SMAD (Sonnylal et coll., 2010).

1.4.2.3 PDGF

Le **PDGF** est un puissant facteur de croissance profibrosant qui agit en **synergie avec TGF β ₁**. PDGF est synthétisé par les plaquettes, les macrophages tissulaires, les fibroblastes activés et, enfin, par les myofibroblastes. Il en existe 4 isoformes : **PDGF-A, B, C et D**.

La protéine biologiquement active de PDGF est sous forme de dimères liés. Il existe 4 types d'homodimères (PDGF-AA, le PDGF-BB, PDGF-CC et PDGF-DD), et un hétérodimère (PDGF-AB) (Trojanowska, 2008).

Les dimères de PDGF A et B (PDGF-AA, -AB et -BB) jouent un rôle important dans la fibrose. Ils permettent la prolifération des myofibroblastes et induisent la stimulation de la synthèse de collagène (Bonner, 2004). La fonction de PDGF-C et -D dans la fibrose est moins connue. PDGF-C pourrait avoir un rôle dans la fibrose pulmonaire (Zhuo et coll., 2004) et cardiaque (Pontén et coll., 2003) tandis que PDGF-C et PDGF-D interviendraient dans la fibrose rénale (Eitner et coll., 2003 ; Ostendorf et coll., 2003).

Il existe 2 types de récepteurs membranaires à activité tyrosine-kinase : **PDGFR α et β** . PDGF-A active PDGFR α uniquement alors que PDGF-B peut activer les 2 récepteurs, PDGFR α et PDGFR β . PDGF-AB et PDGF-C activent PDGFR α et PDGFR $\alpha\beta$ tandis que PDGF-D active préférentiellement PDGFR β (Betsholtz, 2003).

PDGF induit la **migration et la prolifération** des cellules mésenchymateuses au site de l'agression. La fixation du PDGF à son récepteur induit son auto-phosphorylation et l'activation des voies **MEK/ERK** et **PI3K/AKT (Figure 14)**, qui sont toutes les deux également impliquées dans la signalisation SMAD-indépendante de TGF β . Il stimule également la prolifération, la survie et la migration des myofibroblastes (Trojanowska, 2008).

Cependant, la régulation du PDGF et de son récepteur varie fortement selon l'organe impliqué (Bonner, 2004). Dans le poumon, l'activation de PDGFR α induit la prolifération des myofibroblastes (Bonner et coll., 1995) alors que dans le foie, les cellules stellaires (des cellules fibroblastiques périvasculaires qui, après activation, régulent la réparation tissulaire après lésion du parenchyme hépatique) sont stimulées par l'intermédiaire du PDGFR β (Borkham-Kamphorst et coll., 2004).

Dans la majorité des fibroses, $TGF\beta_1$ inhibe $PDGFR\alpha$ dans les myofibroblastes alors que dans les sclérodermies, $TGF\beta_1$ l'induit (Yamakage et coll., 1992). Dans la fibrose hépatique également, $TGF\beta_1$ induit l'expression de $PDGFR\beta$ (Pinzani et coll., 1989).

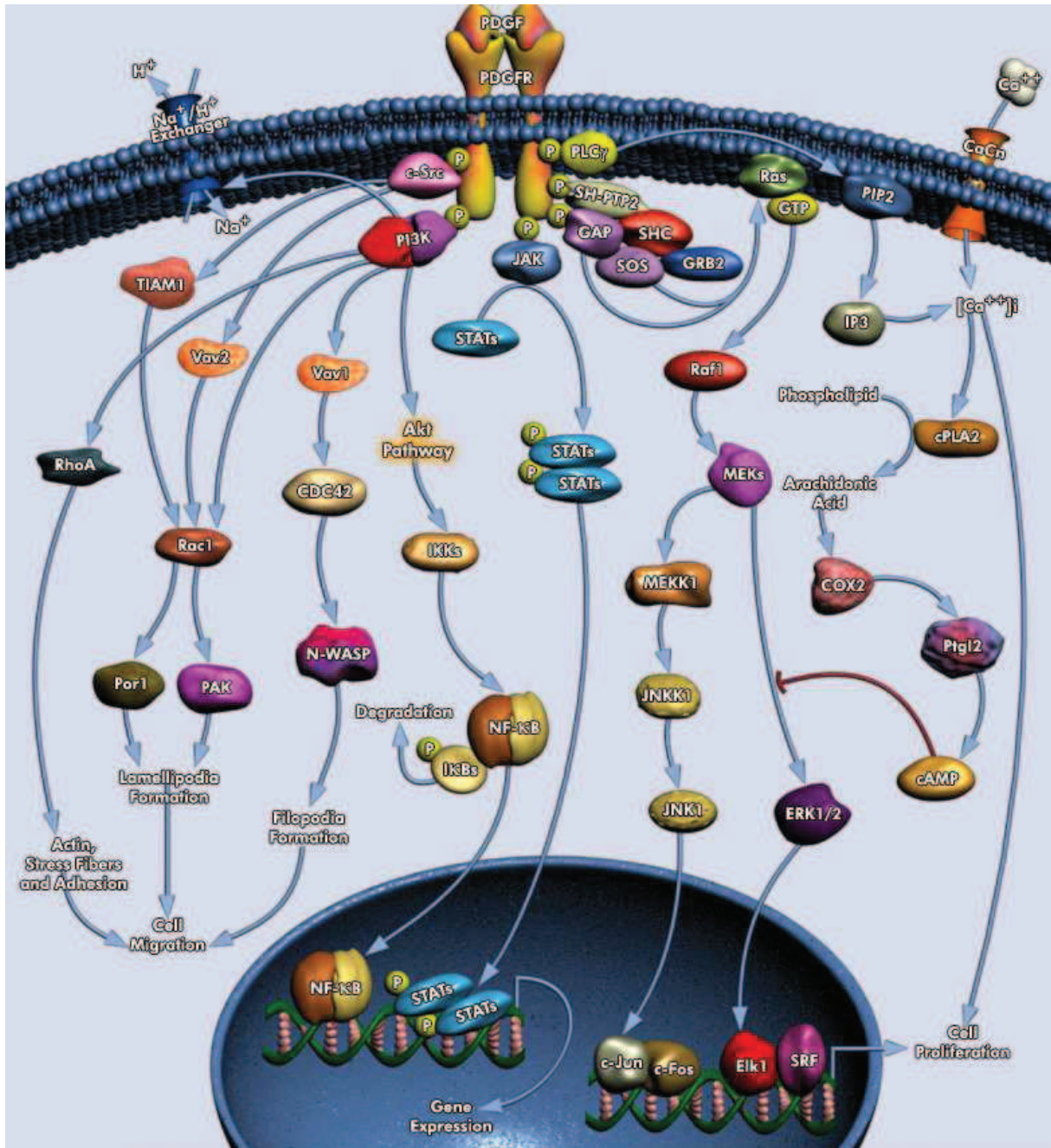


Figure 14 : Voies de signalisation de PDGF (site internet 1)

1.4.3 Recrutement des cellules inflammatoires

L'inflammation précède généralement la fibrose (Wynn et Barron, 2010).

Le **recrutement des cellules inflammatoires** au site de l'agression est une étape importante de la cicatrisation. $TGF\beta_1$ est un puissant chimioattractant pour les monocytes-

macrophages. De plus, les **chimiokines** MCP-1, MCP-2, MCP-3, l'ostéopontine, et enfin les chimiokines MIP-2 et MIP-1 (MIP pour « macrophage inflammatory protein ») sont aussi impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires.

Les **neutrophiles** sont les premières cellules impliquées ; ils éliminent les débris cellulaires et phagocytent les corps apoptotiques. Lorsqu'ils dégranulent, ils libèrent des cytokines inflammatoires et profibrosantes (Wynn, 2007).

Une fois recrutés depuis le compartiment sanguin, les **monocytes** s'infiltrent dans les tissus endommagés et peuvent se différencier en deux familles spécialisées de macrophages (**Figure 15**) : les macrophages de type **M1**, activés par la voie dite « classique » (induits par l'Interféron- γ (IFN- γ), le TNF- α et le lipopolysaccharide) et les macrophages de type **M2**, activés par la voie dite « alternative » (induits par l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10, le M-CSF, « Macrophage-Colony Stimulating Factor » et TGF β) (Ricardo et coll., 2008).

Les **macrophages M1** sont principalement impliqués dans la formation de radicaux libres et de **cytokines pro-inflammatoires** (TNF α et IL-1 β) (réponse dite « Th1 »), qui, s'ils sont trop nombreux, ils peuvent devenir toxiques pour les cellules résidentes (Ricardo et coll., 2008). Ils expriment l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23 et iNOS.

Les macrophages de type **M2** sont, quant à eux, de « type **anti-inflammatoire** » car ils expriment l'IL-10. Cependant, ils synthétisent des **cytokines pro-fibrosantes** telles que le TGF β , le PDGF et le CTGF (réponse dite « Th2 »). De nombreuses **chimiokines** sont aussi synthétisées par les macrophages. Elles permettent le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires. Les macrophages M2 expriment l'IL-10, le récepteur au mannose, l'arginase-1, l'IGF1 et le TGF β .

Les macrophages sont la **principale source de TGF β ₁ et de PDGF**. Les macrophages activés aggravent donc indirectement la fibrose en sécrétant de nombreux médiateurs qui initient et maintiennent la cascade inflammatoire (Wynn et Barron, 2010).

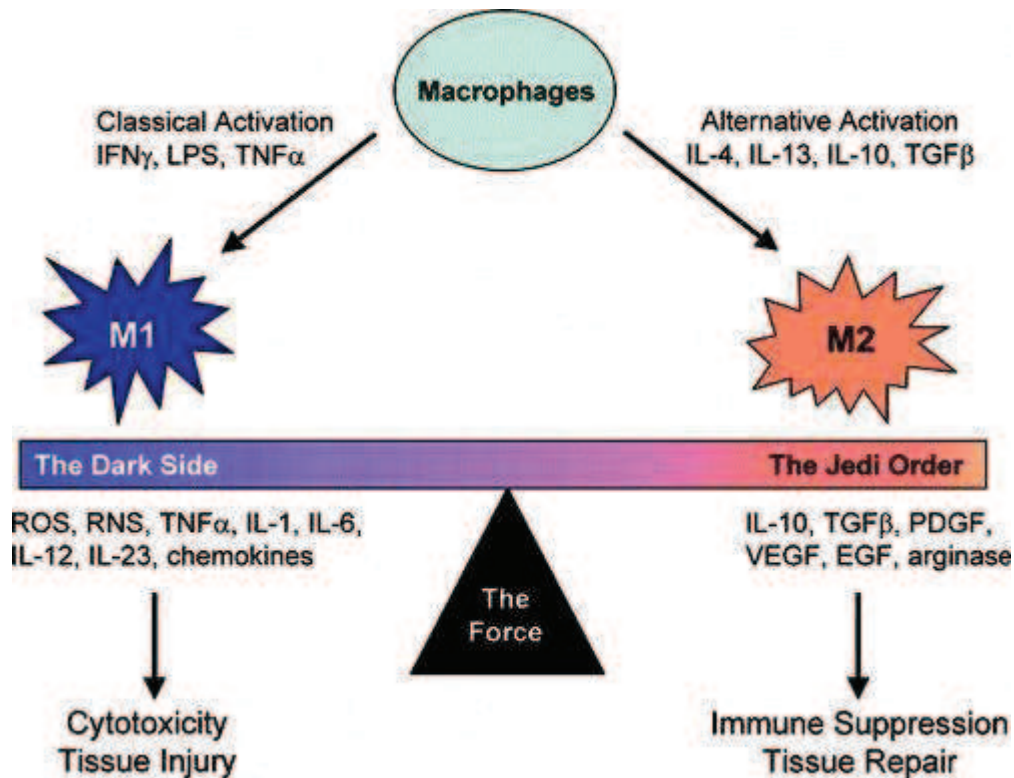


Figure 15 : Macrophages de type M1 et M2 (Laskin, 2009)

Lors du 6^e symposium concernant la fibrose, Cantley (2012) a montré que, dans le rein, après une ischémie suivie d'une reperfusion, les macrophages M1 sont d'abord recrutés (48 heures après l'ischémie) alors que les macrophages M2 sont recrutés plus tardivement (5 jours après l'ischémie) et persistent dans le rein au niveau de la médullaire (mais pas dans le cortex), où ils induisent une fibrose. Ces macrophages M2 semblent induire une fibrose indépendamment de TGF β , dans ce modèle expérimental. Un phénomène de « switch » phénotypique de M1 en M2.

Néanmoins, les macrophages jouent aussi un **rôle dans la réparation** ou la **régression** de la fibrose. L'induction ou le ralentissement de la fibrose par les macrophages dépend du type des cellules mortes phagocytées. Les cellules lésées vont mourir soit par apoptose, soit par nécrose. Dans ces deux cas, les macrophages vont phagocyter les cellules mortes. Cependant, ils ralentissent généralement l'inflammation quand ils phagocytent les cellules apoptotiques, et ils la favorisent lorsqu'ils phagocytent les cellules nécrotiques (Hotchkiss et coll., 2009 ; Rock et Kono, 2008).

Enfin, les macrophages **M1** sont la principale source des **MMPs** (MMP1, MMP2, MMP8, MMP9, MMP13) enzymes qui dégradent, notamment, le collagène (les MMP-1, 8 et 13 sont des collagénases) (Wynn et Barron, 2010).

Enfin, les lymphocytes T et B sont aussi recrutés au site de l'agression où ils sécrètent des cytokines profibrosantes (IL-4, IL-6, IL-13, TGF- β , oncostatine M) (Luzina et coll., 2008). En

effet, dans la sclérodémie, une importante infiltration de lymphocytes T CD4 et de lymphocytes B est observée (Gabrielli et coll., 2009). Il semble que le développement de la fibrose soit associé à l'activité des lymphocytes T CD4 (Ishikawa et coll., 2009). De plus, durant les phases précoces de la fibrose, les lymphocytes B jouent un rôle important, mais ils ne semblent pas être impliqués dans le maintien de la fibrose (c'est-à-dire, lors des phases tardives) (Hasegawa et coll., 2006).

1.4.4 Autres acteurs de la fibrose

1.4.4.1 Interleukine-13 (IL-13)

L'IL-13 présente un rôle **pro-inflammatoire** (par le biais des récepteurs de chimiokines CCR1/CCR2) et un rôle **pro-fibrosant** (par le biais de TGFβ) (**Figure 16**). Elle pourrait donc avoir un rôle primordial dans les fibroses, comme cela a pu être démontré dans la fibrose pulmonaire sur des modèles murins (Homer et coll., 2011).

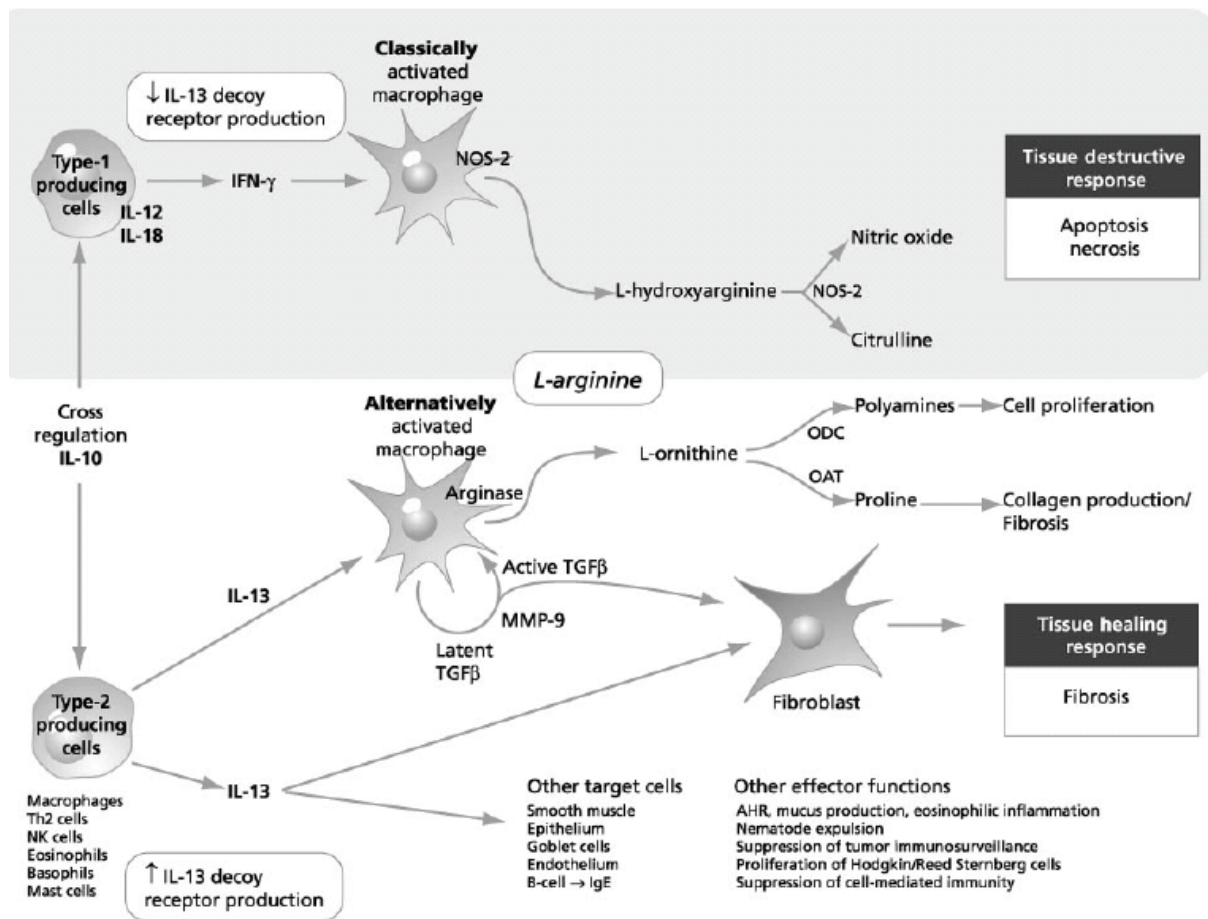


Figure 16 : Fonctions d'IL-13 (Wynn, 2003)

L'interleukine IL-13 se lie à 2 récepteurs : IL-13Rα1 et IL-13Rα2.

Lorsque le récepteur **IL-13Rα1** est exprimé seul, il se lie à l'IL-13 avec une faible affinité. Or, s'il est exprimé conjointement à IL-4Rα, le récepteur à l'interleukine IL-4, un complexe de

haute affinité se forme et induit l'activation des voies de signalisation JAK/STAT. Ce complexe **IL-13 α 1/IL-4 α** constitue également le récepteur de type II de l'IL-4.

A l'inverse, l'autre récepteur **IL-13R α 2** lie l'IL-13 avec une forte affinité et était autrefois considéré comme un **récepteur « leurre »**, sans activité biologique. Il a été, depuis, montré qu'il diminuait les effets d'IL-13, il pourrait ainsi améliorer la progression des fibroses établies. Il **inhibe les effets d'IL-13** en bloquant son interaction avec le complexe IL-13 α 1/IL-4 α (Wynn, 2003).

De plus, il a été suggéré que la voie de signalisation d'IL-13 fait d'abord intervenir le récepteur IL-13 α 1/IL-4 α et le récepteur de TNF α , puis dans un deuxième temps, le récepteur IL-13R α 2 qui induit à son tour la production de **TGF β** (Fichtner-Feigl et coll., 2006).

1.4.4.2 Angiotensine II

L'**angiotensine II**, produit par les macrophages et les fibroblastes, est impliquée dans le développement des fibroses rénales, cardiaques et hépatiques. Elle induit directement l'activité NADPH oxydase, stimulant la **sécrétion de TGF β ₁**, induisant ainsi la prolifération des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes (Bataller et coll., 2003 ; Rosenkranz, 2004).

L'angiotensine II agit également sur la voie de signalisation du TGF β ₁, en augmentant le taux de **SMAD 2** et en augmentant la translocation nucléaire de **SMAD 3 phosphorylé**.

1.4.4.3 Klotho

Klotho est une protéine transmembranaire exprimée dans les cellules épithéliales des tubules rénaux. La protéine Klotho se lie directement au récepteur de type II du TGF β et **inhibe la liaison du TGF β ₁** aux récepteurs de surface cellulaire, inhibant ainsi la voie de signalisation de TGF β ₁.

Klotho inhibe également **la TEM**, activée par TGF β ₁, et sont également associés une diminution de l'expression du marqueur épithélial, une augmentation de l'expression du marqueur mésenchymateux, ainsi qu'une augmentation de la migration cellulaire. Outre son action inhibitrice sur TGF β ₁, Klotho inhibe les voies de signalisation du Wnt (« Wingless-type MMTV integration site family member ») et d'IGF-1 (« insulin-like growth factor-1 »), deux voies qui peuvent également favoriser la TEM (Doi et coll., 2011).

1.4.4.4 Endothéline-1

L'**endothéline-1** (ET-1) intervient dans la fibrose (Clozel et Salloukh, 2005). ET-1 agit en association avec d'autres facteurs profibrosants afin de recruter les fibroblastes et de les différencier en myofibroblastes. En effet, **TGF β ₁** induit la transcription d'ET-1 via des voies dépendantes ou non de SMAD. ET-1 augmente ensuite l'expression du facteur de transcription **NF κ B** et, avec TGF β , elle augmente également l'expression de **CTGF**. Par rétrocontrôle autocrine, ET-1 active sa propre synthèse. Ce processus conduit, *in fine*, à la **différenciation des fibroblastes en myofibroblastes** (Ross et coll., 2010) (**Figure 17**).

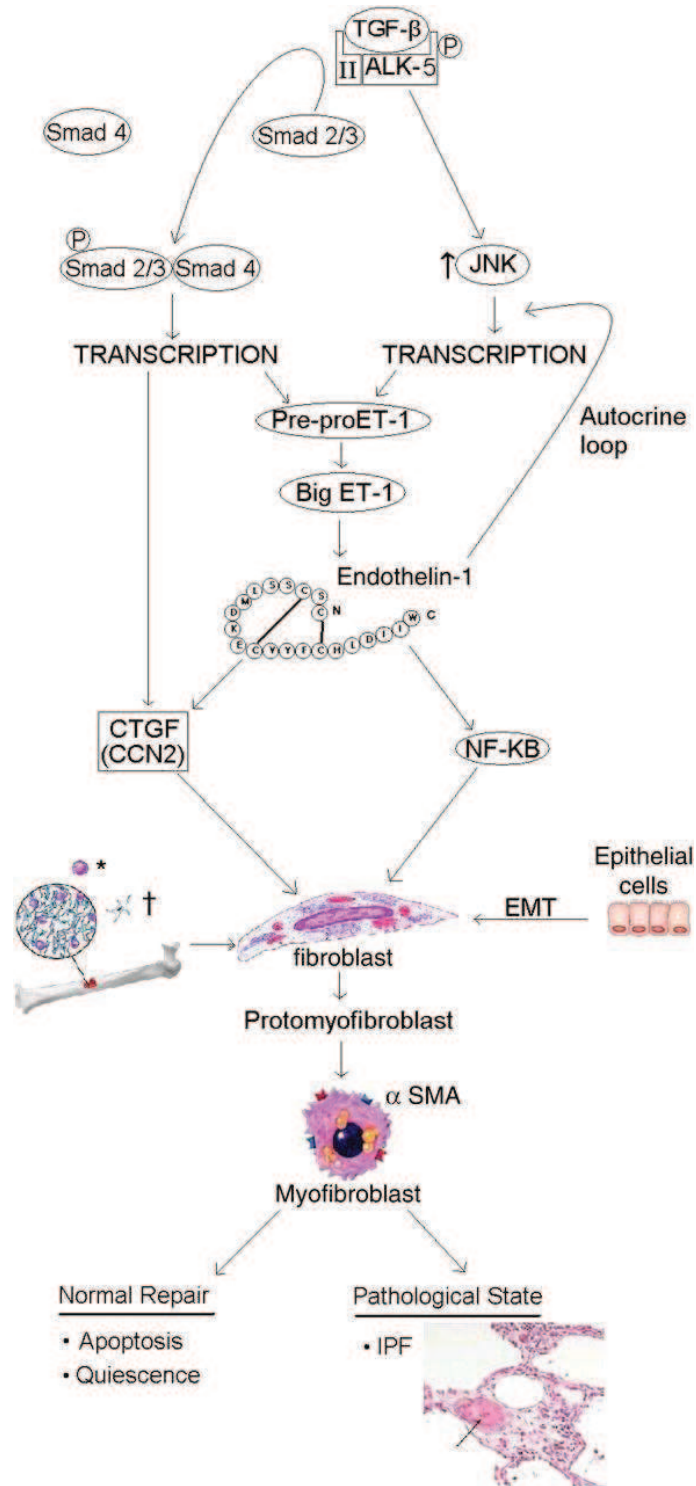


Figure 17 : Fonction d'ET-1 dans la fibrose (Ross et coll., 2010)

L'expression des récepteurs à l'ET-1 est augmentée dans les poumons de patients souffrant de sclérodermies (Abraham et coll., 1997). De plus, l'inhibition des récepteurs ET_A et ET_B (par le bosentan, un antagoniste de ces deux récepteurs) dans des fibroblastes de poumon prévient l'induction de facteurs profibrosants (induits par le TGFβ), tels que le collagène de type I, la fibronectine, ou le CTGF (CCN2) (Shi-Wen et coll., 2007). *In vivo*, le blocage d'ET-1

par le bosentan prévient l'apparition de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez le Rat (Schroll et coll., 2010).

1.4.4.5 P2X7

Le **récepteur purinergique P2X7** est un canal ionique, qui est essentiellement exprimé par les cellules du système hématopoïétique, telles que les mastocytes, les monocytes et macrophages mais également au niveau des fibroblastes, des cellules gliales, neuronales ou épithéliales (Gever et coll., 2006).

Le récepteur P2X7 est principalement impliqué dans le **transport d'ions** (Ca^{2+} , Na^+ et K^+), mais il agit également sur d'autres voies de signalisation intracellulaires telles que la voie **PI3K** ou **ERK1/2** et il régule la **mort cellulaire**.

Des études (Gonçalves et coll., 2006 ; Labasi et coll., 2002) suggèrent que P2X7R aurait un rôle **pro-inflammatoire**. De plus, il pourrait avoir un rôle dans la **fibrose** car il a été montré qu'il induisait un dépôt de collagène et l'expression de TGF β (Gonçalves et coll., 2006 ; Solini et coll., 2004 ; Wang et coll., 2003).

1.4.4.6 PPAR- γ

Le récepteur activé de prolifération des peroxyosomes **PPAR- γ** (« peroxisome proliferator-activated receptor gamma ») est une des 3 isoformes (α , β , γ) du récepteur nucléaire PPAR. Il agit comme un **facteur de transcription**. Il est exprimé majoritairement par les adipocytes, dont il stimule la différenciation (Rosen et Spiegelman, 2001), mais aussi les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires ainsi que les fibroblastes.

Il a été initialement décrit comme un régulateur de l'adipogenèse (Tontonoz et coll., 1994). Des études récentes suggèrent un nouveau rôle de PPAR- γ dans la réparation tissulaire, associée à des propriétés anti-fibrosantes (Wei et coll., 2012) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Activités anti-fibrosantes des ligands PPAR- γ (Wei et coll., 2012)

Inhibition de l'expression génique et/ou de la transformation myofibroblastique (cellules en culture)	Modèles de Rongeurs où un ligand PPAR γ a atténué la fibrose
Cellules étoilées du foie (aussi appelées cellules stellaires ou cellules de Ito)	Fibrose hépatique induite par un déficit en choline dans la nourriture
Hépatocytes	Stéatohépatite (avec fibrose)
Cellules d'hépatome	Fibrose hépatique induite par le thioacétamide
	Fibrose hépatique induite par <i>Schistosoma japonicum</i>
Cellules mésangiales rénales	Lésions rénales du greffon suite à une transplantation
Cellules endothéliales glomérulaires	Insuffisance rénale chez des rats hypertendus
Fibroblastes rénaux	Diabète associée à une glomérulosclérose, à une fibrose tubulointerstitielle
	Fibrose hépatique par ligature du conduit biliaire
Fibroblastes pulmonaires	Fibrose pulmonaire induite par la bléomycine
Cellules épithéliales alvéolaires	Hypertension pulmonaire (induite par l'hypoxie)
Fibroblastes cardiaques	Insuffisance cardiaque induite par pression de surcharge
Cellules musculaires cardiovasculaires	Fibrose cardiaque (Rat diabétique de type II)
Fibroblastes normaux de peau et SSc	Fibrose cutanée induite par la bléomycine

Différents ligands (**Tableau 3**) sont capables de se lier à PPAR- γ et de contrôler l'expression des gènes régulés par celui-ci. La 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2) est un ligand naturel de PPAR- γ . Des molécules de la classe pharmacologique des **thiazolidinediones**, dont la troglitazone et la rosiglitazone, qui ont été développées comme antidiabétiques, sont des agonistes de haute affinité de PPAR- γ .

Le TGF β , l'hypoxie, l'IL-13, le CTGF (CCN2) et l'acide lysophosphatidique (LPA) sont des inhibiteurs de l'expression de PPAR- γ (Wei et coll., 2012).

Tableau 3 : Exemples de ligands de PPAR- γ (d'après Wei et coll., 2012)

Agonistes naturels	Thiazolidinediones
Acide gras insaturé	Troglitazone
Acide nitrolinoléique	Ciglitazone
Acide arachidonique	Pioglitazone
15d-PGJ2	Rosiglitazone

Après fixation du ligand, le complexe ligand/PPAR- γ forme, dans un premier temps, un **hétérodimère** avec le **récepteur de l'acide rétinoïque** puis interagit avec la **séquence PPREs** (ou « PPAR- γ response elements ») située sur les promoteurs des gènes cibles, afin de réguler leur transcription (Berger et Moller, 2002).

Les ligands de PPAR- γ régulent les **réponses fibrosantes** induites par TGF β (Ghosh et coll., 2004). Ces effets anti-fibrosants impliquent la **voie de signalisation dépendante de SMAD** (Ghosh et coll., 2004 ; Zhao et coll., 2006) (**Figure 18**). PPAR γ pourrait bloquer le coactivateur

des SMADs, p300 (Ghosh et coll., 2009). De plus, chez le Rongeur, le traitement par des agonistes synthétiques de PPAR- γ diminue les fibroses hépatiques (Galli et coll., 2002 ; Uto et coll., 2005), cardiaques (Maejima et coll., 2011 ; Shiomi et coll., 2002), pulmonaires (Aoki et coll., 2009 ; Milam et coll., 2008) ou rénales (Kawai et coll., 2009 ; Yoshihara et coll., 2011).

Par ailleurs, l'expression de PPAR- γ est diminuée dans les tissus lésés dans les modèles de fibrose et de sclérodermie chez le Rongeur (Wu et coll., 2009a) ainsi que chez les patients souffrants d'alopécie (Karnik et coll., 2009) et dans la peau de patients atteints de SSc (Wei et coll., 2010).

Il a récemment été montré que les ligands de PPAR- γ (le CDDO, ou « 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid » et le 15d-PGJ₂) inhibent la différenciation des fibroblastes, issus de patients souffrants de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), en myofibroblastes, **en bloquant la phosphorylation d'Akt**, donc en inhibant une voie de signalisation de TGF β indépendante des SMADs (Kulkarni et coll., 2011) (**Figure 19**). Cette inhibition est indépendante de la voie MAPK-p38 et du gène suppresseur de tumeur PTEN (« Phosphatase and TENSin homolog ») mais dépendante de la phosphorylation de la kinase FAK (« focal adhesion kinase », qui agit en amont d'Akt) induite par le TGF β .

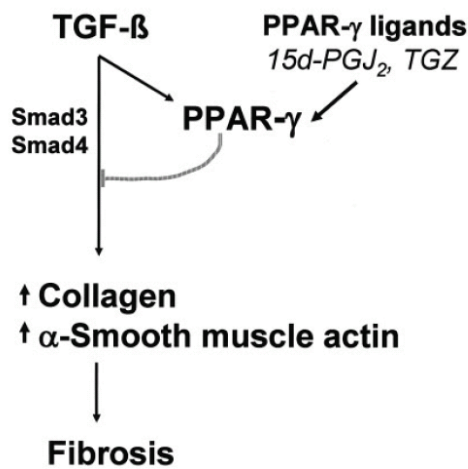


Figure 18 : Voie de signalisation de PPAR γ SMAD-dépendante (Gosh et coll., 2004)

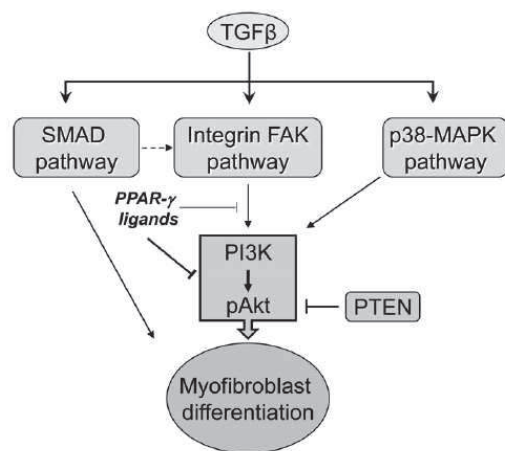


Figure 19 : Voie de signalisation de PPAR γ SMAD indépendante (Kulkarni et coll., 2011)

Les thiazolidinediones peuvent bloquer la voie de signalisation profibrosante de Wnt et par conséquent la différenciation fibroblastique (Gustafson et coll., 2010). Un autre ligand agoniste, GW1929, bloque l'activité transcriptionnelle de la β -caténine de manière PPAR- γ dépendante (Lu et Carson, 2010). Par conséquent, les ligands PPAR- γ présentent également des propriétés anti-fibrosantes en agissant sur la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

1.4.4.7 Early growth responses (Egr)

Egr-1 est le principal membre d'une famille de gènes à réponse précoce, comprenant aussi Egr-2, Egr-3 et Egr-4. Le gène Egr-1 code pour un facteur de transcription à motifs en doigt de zinc, nommé Egr-1. L'expression d'Egr-1 est induite au niveau du site de l'agression par des cytokines, des lipides, impliquant la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Wei et coll., 2011a).

Il a été montré que TGF β induit rapidement mais de façon transitoire l'expression d'Egr-1 dans des fibroblastes dermiques normaux, *via* la voie **C-Abl-ERK1/2**, indépendamment des SMADs (Chen et coll., 2006 ; Bhattacharyya et coll., 2008). De plus, l'expression d'Egr-1 est augmentée au niveau des zones lésées chez des souris atteintes de sclérodermie (induite par la bléomycine). Un phénomène similaire a été observé dans la peau et les poumons de patients atteints de SSc (Bhattacharyya et coll., 2008).

L'induction d'Egr-1 est inhibée par l'imatinib, une molécule largement prescrite en Oncologie, qui bloque la **tyrosine kinase C-Abl** (Bhattacharyya et coll., 2011a). En effet, C-Abl induit directement l'expression d'Egr-1 dans des fibroblastes dermiques (Bhattacharyya et coll., 2009b). Bien que les souris KO pour Egr-1 soient viables et d'une apparence « normale », la sévérité de la fibrose induite par la bléomycine chez ces animaux est nettement atténuée (Wu et coll., 2009b). De plus, chez des souris KO pour Egr-1, la fibrose pulmonaire induite par TGF β ou l'IL-13 ne se développe pas (Cho et coll., 2006). Par ailleurs, Egr-1 stimule le **coactivateur p300**, impliqué dans la voie de signalisation SMAD-dépendante du TGF β (Bhattacharyya et coll., 2011a), comme nous l'avons vu plus haut.

En résumé, ces résultats démontrent un effet profibrosant pour Egr-1 (par l'intermédiaire de TGF β), par une voie SMAD-dépendante (p300) mais aussi par une voie indépendante de SMAD (C-Abl) (Wei et coll., 2011a) (**Figure 20**).

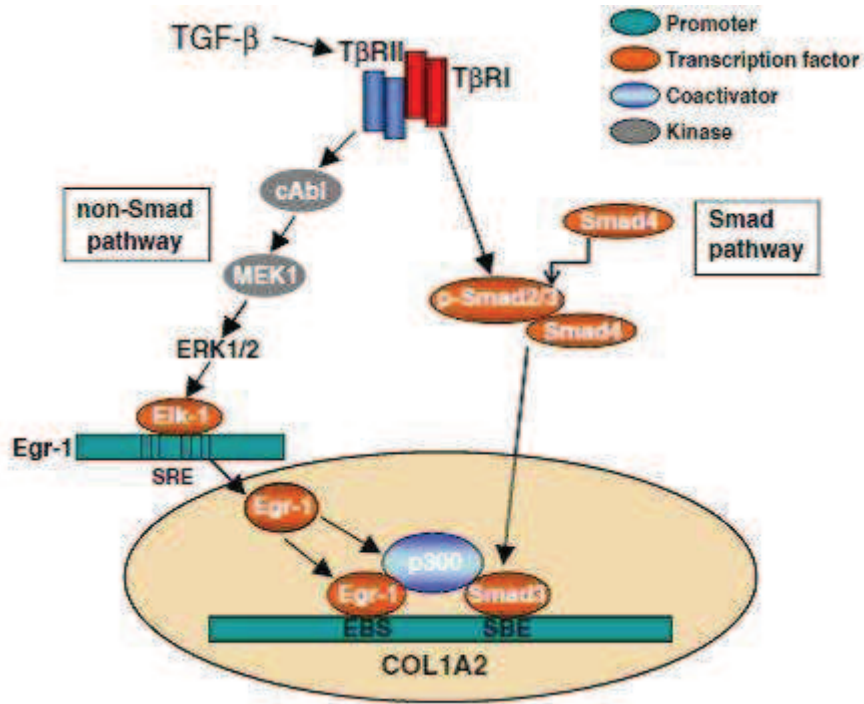


Figure 20 : Rôle d'Egr-1 dans la fibrose (Battacharyya et coll., 2011a)

Par ailleurs, le facteur de transcription **Egr-2** pourrait également induire des phénomènes profibrosants par l'intermédiaire de TGFβ (Fang et coll., 2011). Cependant, contrairement à Egr-1, qui est rapidement mais transitoirement induit, en réponse à TGFβ, la stimulation d'Egr-2 est retardée mais maintenue.

Egr-1 peut induire directement l'expression d'Egr-2 par l'intermédiaire de la voie ERK1/2 (Fang et coll., 2011).

Les voies **ERK1/2** et **SMAD 2/3** peuvent également stimuler directement Egr-2. Il peut ensuite stimuler la transcription du gène COL1A2 (**Figure 21**). L'expression ectopique d'Egr-2 dans les fibroblastes normaux induit directement l'expression d'un grand nombre de gènes pro-fibrosants. De plus, Egr-2 est surexprimé dans des biopsies de peau et pulmonaires de patients atteints de SSc. Ainsi, Egr-2 joue un rôle distinct et fonctionnellement non redondant dans la régulation de la MEC et dans la fibrose (Battacharyya et coll., 2011a).

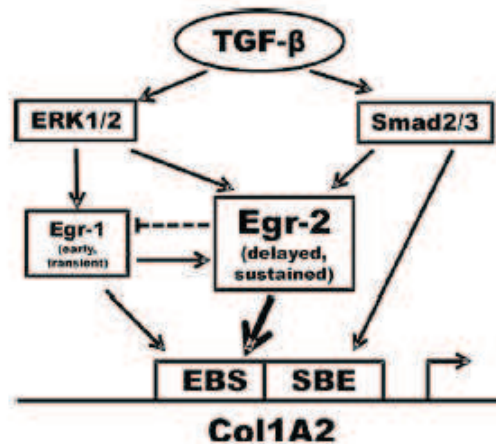


Figure 21 : Hypothèses du rôle d'Egr-2 dans la fibrose induite par TGFβ (Fang et coll., 2011)

1.4.4.8 PTEN

PTEN a été initialement identifié comme un gène suppresseur de tumeur. Son activité de phosphatase des phospholipides a été mise en évidence ultérieurement. Il est très souvent muté dans de nombreux cancers (glioblastomes, cancers de la prostate et de l'endomètre, notamment) (Tsugawa et coll., 2002).

PTEN régule **négativement la kinase Akt** en inhibant sa phosphorylation (Wu et coll., 1998). Il inhibe donc la voie de signalisation **PI3K/Akt**, qui est impliquée dans la synthèse de collagène et la prolifération de fibroblastes. La voie PI3K/Akt est impliquée dans la voie de signalisation SMAD-indépendante du TGF β et également dans celle de PDGF.

Une étude récente (Parapuram et coll., 2011) a montré que l'expression de PTEN est diminuée dans des fibroblastes dermiques issus de patients souffrant de SSc diffuse. Dans un deuxième temps, ils ont étudié les conséquences *in vivo* de la délétion de PTEN au niveau de fibroblastes murins. La perte de PTEN induit une augmentation de l'épaisseur du derme (avec un dépôt de collagène important) et est associée à une augmentation d'Akt phosphorylé et de l'expression de **CTGF**.

Selon une étude présentée par la même équipe lors du 12^e Congrès International sur les Sclérodermies (Liu et coll., 2011b), le phénotype de souris KO pour PTEN et pour CTGF est normal contrairement à celui de souris KO uniquement pour PTEN (où les souris meurent pendant leur développement prénatal). Ces résultats suggèrent un rôle majeur pour CTGF dans la voie inhibée par PTEN (**Figure 22**).

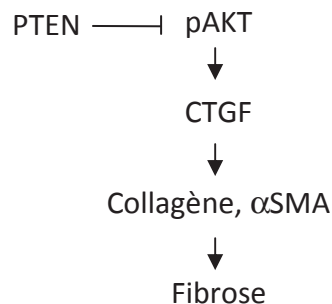


Figure 22 : Voie de signalisation inhibée par PTEN

Le TGF β peut également inhiber l'expression de PTEN (Kato et coll., 2009 ; Yang et coll., 2009). Cependant, l'inhibition du récepteur T β RI (ou ALK₅) ne modifie pas le phénotype des souris KO PTEN (Parapuram et coll., 2011).

1.4.4.9 Nrf2

Nrf2 (« Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ») est un facteur de transcription de la famille des protéines à CNC/bZip (« Cap 'n' Collar/basic leucine zipper »). C'est une protéine pléiotrope qui contrôle l'expression de gènes régulés par des séquences de type ARE

(« antioxidant responsive element »). Il a des fonctions anti oxydantes et anti-inflammatoires (Kim et Vaziri, 2010).

Une étude, suggérant Nrf2 comme nouveau facteur anti-fibrosant, a été présentée au 12^e Congrès International sur les Sclérodermies (Wei et coll., 2011b). Le CDDO (un triterpénoïde synthétique, agoniste de PPAR γ) induit l'expression de Nrf2 dans des fibroblastes normaux mais indépendamment de PPAR γ . Les effets anti-fibrosants de CDDO sont dépendants de Nrf2. L'expression de Nrf2 est diminuée dans les biopsies de peaux issues de patients SSc. Ils ont également montré que Nrf2 bloque la synthèse du collagène et la différenciation des myofibroblastes induite par TGF β dans des fibroblastes normaux. La suppression de Nrf2 chez des souris accentue la fibrose induite par la bléomycine.

Nrf2 semble donc être une cible potentielle pour des traitements anti-fibrosants.

L'implication de Nrf2, par l'intermédiaire de l'inhibition de la voie TGF β -SMAD, a aussi été montrée dans un modèle de fibrose rénale (Oh et coll., 2012) et de fibrose cardiaque (Xing et coll., 2012).

1.4.4.10 Wnt- β -caténine

La famille de glycoprotéines **Wnt** joue un rôle important dans l'embryogenèse. La réactivation aberrante de cette voie chez l'adulte est généralement associée à certaines maladies dont le cancer et la fibrose (Wei et coll., 2011c).

Il existe 2 voies de signalisation : la voie canonique, qui fait intervenir la **β -caténine**, et la voie non canonique. En ce qui concerne la voie canonique, lorsque le ligand Wnt se lie au récepteur « Frizzled », il l'active, induisant ainsi l'inhibition du complexe axine/APC/GSK-3. Le complexe ne pourra plus phosphoryler la β -caténine (et, par conséquent, en induire la dégradation). La β -caténine étant un facteur de transcription, elle peut être transloquée dans le noyau de la cellule-cible des Wnt et stimuler, de ce fait, l'expression de gènes spécifiques. A l'inverse, en l'absence de ligand Wnt, la β -caténine est phosphorylée, ce qui en induit son ubiquitination, c'est-à-dire la liaison d'ubiquitine, marqueur de protéines à éliminer et, par conséquent, sa dégradation (Königshoff et Eickelberg, 2010) (**Figure 23**).

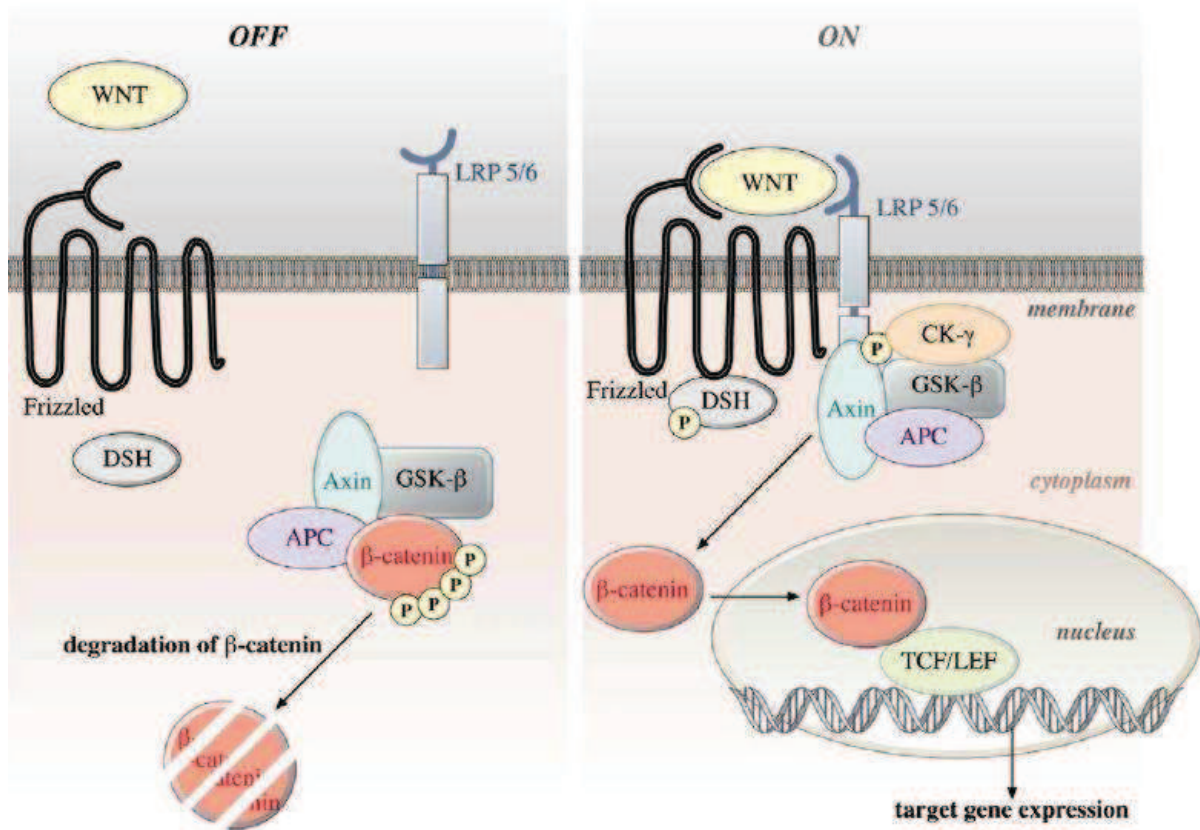


Figure 23 : Voie de signalisation Wnt (Königshoff et Eickelberg, 2010)

L'expression des ligands Wnt (tels que Wnt2, Wnt5a) est augmentée chez des patients souffrant de fibrose pulmonaire (Königshoff et Eickelberg, 2010) et de SSc (Lemaire et coll., 2010 ; Wei et coll., 2012) mais aussi de la β -caténine (Hamburg et Rhadika, 2012). L'expression de la β -caténine chez les patients souffrant de certaines pathologies (dont la FSN) est située au niveau de l'hypoderme, et donc du tissu adipeux (Hamburg et Rhadika, 2012).

La source du ligand Wnt dans la fibrose et la SSc et les facteurs responsables de l'activation aberrante de cette voie ne sont pas connus. Différentes études suggèrent l'existence d'un **lien entre le TGF β et la β -caténine**. Les effets profibrosants de la β -caténine semblent dépendants du TGF- β , mais le mécanisme n'est pas connu (Lam et coll., 2011 ; Wei et coll., 2011c). Une meilleure compréhension de la voie de signalisation de Wnt pourrait permettre de nouvelles approches thérapeutiques chez les patients souffrant de fibrose (Lam et coll., 2011).

1.4.4.11 Intégrines

Différentes intégrines **contrôlent l'activation et la localisation de TGF β** . Toutes les intégrines sont composés de sous-unités α et β . La sous-unité β_1 permet la liaison des fibroblastes au collagène I et à la fibronectine et elle a également un rôle (favorisant) dans la

réparation tissulaire (Battacharyya et coll., 2011b). Son expression est induite par TGF β mais son rôle dans l'activation de ce dernier n'est pas entièrement connu. Des souris déficientes en intégrine β_1 au niveau des fibroblastes ne présentent pas de réparation tissulaire et sont protégées de la fibrose induite par la bléomycine (Liu et coll., 2009).

Certaines intégrines peuvent activer les voies de TGF β dans la fibrose (Margadant et Sonnenberg, 2010). Ainsi, l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ est un puissant inducteur de l'activation de TGF β latent (Munger et coll., 1999). Il interagit avec le motif dit « RGD » (tripeptide arginine-glycine-acide aspartique) du LTGF β latent. Chez des souris déficientes en $\alpha_v\beta_6$, une inflammation spontanée du poumon est observée mais ces souris sont protégées de la fibrose induite par la bléomycine.

Le traitement par un anticorps anti- $\alpha_v\beta_6$ permet de bloquer l'activation du TGF β latent et permet de prévenir le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Horan et coll., 2008). L'intégrine $\alpha_v\beta_6$ est donc une cible intéressante pour le traitement des fibroses impliquant l'épithélium car il existe une inhibition de TGF β uniquement au niveau de la lésion et pas dans tout l'organisme, ce qui permettrait de réduire la survenue d'effets indésirables.

Les intégrines $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_v\beta_3$ sont exprimés dans des fibroblastes et activent également TGF β . L'expression de ces intégrines est augmentée dans des fibroblastes de patients souffrant de SSc et elles peuvent moduler l'activation du TGF β latent (LTGF) (Asano et coll., 2004 ; Asano et coll., 2005).

1.4.4.12 Hypoxie

L'hypoxie active **HIF-1** (« Hypoxia-Inducible Factor 1 ») qui stimule la synthèse ses molécules de la MEC dont le collagène et la fibronectine ainsi que la **sécrétion de TGF β** (Distler et coll., 2007). Il a également été montré que l'hypoxie induit la TEM par l'intermédiaire de TGF β et HIF-1 (Higgins et coll., 2007). La délétion de VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor ») (souris « Knock out » pour ce facteur de croissance) induit une amplification de la fibrose pulmonaire (induite par la bléomycine), associée à une augmentation d'HIF-1 et de la voie **Wnt/ β -caténine** (Stockmann et coll., 2010). L'hypoxie pourrait être une voie intéressante principalement pour la fibrose rénale mais également dans les sclérodermies (Lokmic et coll., 2012 ; Distler et coll., 2007).

1.4.4.13 Fli1

Fli1 (« friend leukemia integration-1 ») est un facteur de transcription. Fli1 a été initialement mis en évidence comme proto-oncogène chez des souris souffrant d'érythroleucémie induite par le virus de Friend (Asano et coll., 2010).

Fli1 est exprimé dans les cellules endothéliales et hématopoïétiques et, de façon plus faible, dans les fibroblastes de peau (Asano et coll., 2010). Cette expression est diminuée au niveau de fibroblastes issus de patients SSc (Kubo et coll., 2003 ; Wang et coll., 2006).

Fli1 est un puissant **inhibiteur des gènes codant pour le collagène de type I** (c'est à dire COL1A1 et COL1A2), comme cela a été montré *in vitro* (Czuwara-Ladykowska et coll., 2001) et *in vivo* (Kubo et coll., 2003). Fli1 est **régulé par TGFβ** par l'intermédiaire de la voie **C-Abl/PKC-δ** (SMAD indépendante) et par une cascade de phosphorylation et acétylation afin de le dégrader (**Figure 24**) (Asano et coll., 2010).

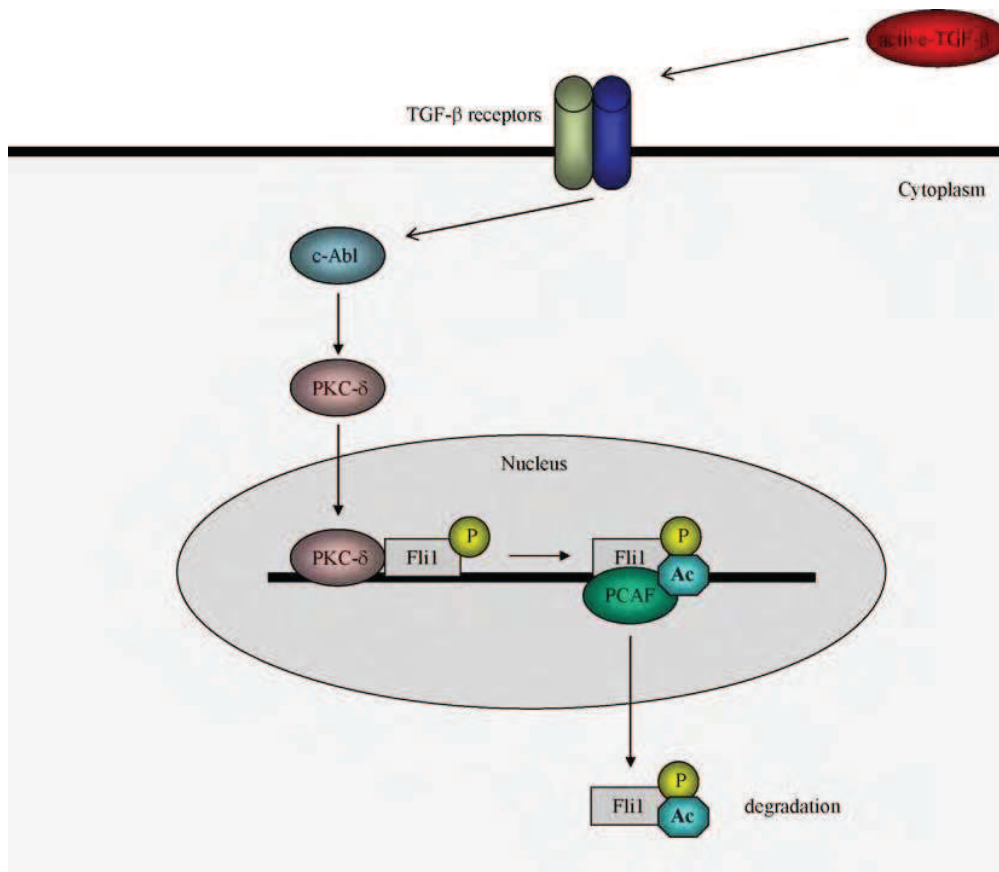


Figure 24 : Voie de régulation de Fli1 par TGFβ (Asano et coll., 2010)

Selon Nakerakanti et coll., (2006), Fli1 inhibe le gène de **CTGF** et il serait également impliqué dans la régulation de la métalloprotéase **MMP-1**.

L'inhibition de Fli1 *in vitro* (par un petit ARN interférant, ou « siRNA ») permet l'activation des fibroblastes, par le biais d'un mécanisme épigénétique, en augmentant la synthèse de collagène, de CTGF et d' α -SMA mais en diminuant celle de la collagénase MMP-1 (Asano et coll., 2010) (**Figure 25**). Les souris KO pour Fli1 (Fli1^{-/-}) meurent rapidement après leur naissance, ne permettant pas d'étudier l'inactivation de Fli1 *in vivo*. Cependant, les souris hétérozygotes Fli1^{+/-} ou les souris présentant une délétion de Fli1 au niveau du domaine C-terminal (Fli1 ^{Δ CTA/ Δ CTA}) se développent normalement mais n'induisent pas de fibrose. Néanmoins, une augmentation de l'expression du collagène de type I est observée chez ces animaux, ainsi que des modifications de la structure des fibres de collagène (**Figure 25**) (Asano et coll., 2010). Ces résultats suggèrent donc un rôle important de Fli1 dans l'activation des fibroblastes, mais ils indiquent aussi que des facteurs complémentaires sont nécessaires afin d'aboutir à une fibrose.

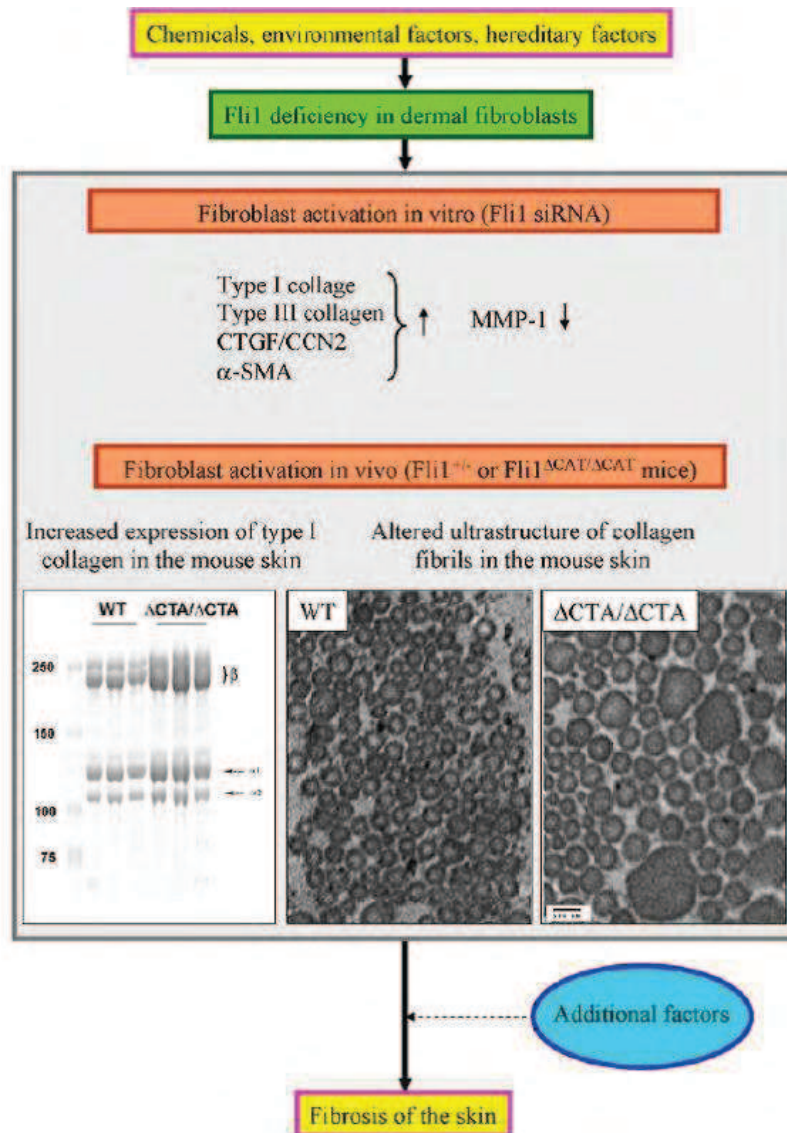


Figure 25 : Conséquences d'un manque de Fli1 dans la fibrose cutanée (SSc) (Asano et coll., 2010)

1.4.4.14 Acide lysophosphatidique

L'**acide lysophosphatidique** (LPA) est un phospholipide. Il existe deux grands types de récepteurs aux LPA : 3 sous-types de récepteurs du LPA, couplés à des protéines G, qui appartiennent à la famille EDG (« endothelial differentiation gene ») (LPA_{1 à 3}) et de 3 sous-types de récepteurs non EDG (LPA_{4 à 6}) (Im, 2012).

Le LPA a longtemps été seulement considéré comme un intermédiaire métabolique de la synthèse des phospholipides membranaires et des lipides neutres. Plus récemment, il a été montré que le LPA se comporte comme un médiateur biologique permettant de réguler différentes processus dont la croissance, la survie ou la migration cellulaire. Le LPA joue donc un rôle important dans **la réparation tissulaire** grâce à son rôle dans la migration et la prolifération cellulaire. Le LPA et ses récepteurs seraient impliqués dans différentes pathologies et notamment dans la fibrose (Pradère et coll., 2008 ; Pradère et coll., 2007 ;

Tager et coll., 2008 ; Castelino et coll., 2011). C'est particulièrement le cas du récepteur **LPA₁**, qui semble être une cible thérapeutique potentiellement fructueuse (Im, 2012).

Une augmentation de la concentration plasmatique de LPA a été récemment observée dans la fibrose (Pradère et coll., 2007).

La fibrose rénale tubulo-interstitielle, induite par obstruction unilatérale de l'urètre, chez la Souris est associée à une augmentation importante de la production de LPA dans les cellules tubulaires proximales ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur **LPA₁** alors que celle des autres récepteurs LPA reste inchangée. De plus, des souris KO pour le récepteur **LPA₁** sont protégées de cette fibrose rénale (Pradère et coll., 2007).

Des concentrations plasmatiques élevées de LPA ont également été observées chez des patients souffrant d'hépatite C (Watanabe et coll., 2007a) ainsi que chez des rats souffrant de fibrose hépatique consécutive à l'administration de tétrachlorure de carbone (Watanabe et coll., 2007b).

Tager et ses collaborateurs (2008) ont rapporté l'implication de **LPA₁** dans la fibrose pulmonaire. En effet, la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est fortement atténuée chez des souris KO pour **LPA₁**. Cette même équipe a également montré que les souris KO pour **LPA₁** développent une fibrose cutanée réduite (après administration de bléomycine) alors que les souris KO pour **LPA₂** ne sont pas protégées (Castelino et coll., 2011). Des concentrations plasmatiques élevées de LPA plasmatiques sont également rapportées chez des patients souffrant de SSc (Pattanaik et Postlethwaite 2010 ; Tokumura et coll., 2009).

Le LPA intervient probablement dans la fibrose par le biais d'une dérégulation de son activité dans la réparation tissulaire. Une étude récente (Cabello-Verrugio et coll., 2011) suggère que l'induction de **CTGF** par le LPA est dépendante de la voie de **TGFβ**, et plus précisément du récepteur **TGFβRI**. De plus, cette étude conclut à l'implication de **SMAD 2/3** dans l'induction de CTGF. Enfin, la réponse au LPA implique l'activation de la voie de signalisation **JNK**, sans faire intervenir le récepteur **TGFβRI**.

Par ailleurs, **LPA₂** peut induire l'activation du **TGFβ latent** par l'intermédiaire de l'intégrine **αvβ₆** dans des cellules épithéliales pulmonaires (Xu et coll., 2009) alors que **LPA₁** pourrait être nécessaire à l'activation de la voie **SMAD-dépendante** de TGFβ dans un modèle murin de sclérodémie (Castelino et coll., 2011).

1.4.4.15 Récepteurs de type Toll (TLRs)

Les **récepteurs de type Toll** (« Toll-like receptors » ou **TLRs**) est une famille de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PPRs ou « pattern recognition receptors »). Il existe entre 10 et 15 types de TLRs chez les Mammifères. A ce jour, 11 TLRs (TLR₁ à TLR₁₁) ont été identifiés chez l'Homme.

Ce sont des récepteurs transmembranaires présents chez de nombreuses espèces (Vertébrés et Invertébrés). Ils sont exprimés par les cellules de l'immunité innée (les

monocytes et macrophages, les cellules dendritiques) mais également par des cellules non immunitaires comme les kératinocytes ou les fibroblastes.

L'activation du TLR induit une cascade de signalisation et aboutit à la translocation nucléaire du facteur de transcription NFκB. Les TLRs peuvent reconnaître des structures moléculaires associées aux pathogènes (PAMPs ou « pathogen-associated molecular patterns ») ou être activés par des ligands endogènes physiologiques (DAMPs ou « damage-associated molecular patterns »). Ils initient ensuite la réponse immune immédiate et la réponse inflammatoire par libération de cytokines pro-inflammatoires (Musette et coll., 2006).

Les TLRs seraient impliqués dans la réparation tissulaire et la fibrose (**Figure 26**) (Huebenera et Schwabea, 2012). La stimulation de TLR₄ pourrait notamment avoir un effet direct sur le développement de la fibrose hépatique, il induit la signalisation de TGFβ et l'expression de chimiokines par les cellules étoilées du foie (Seki et coll., 2007).

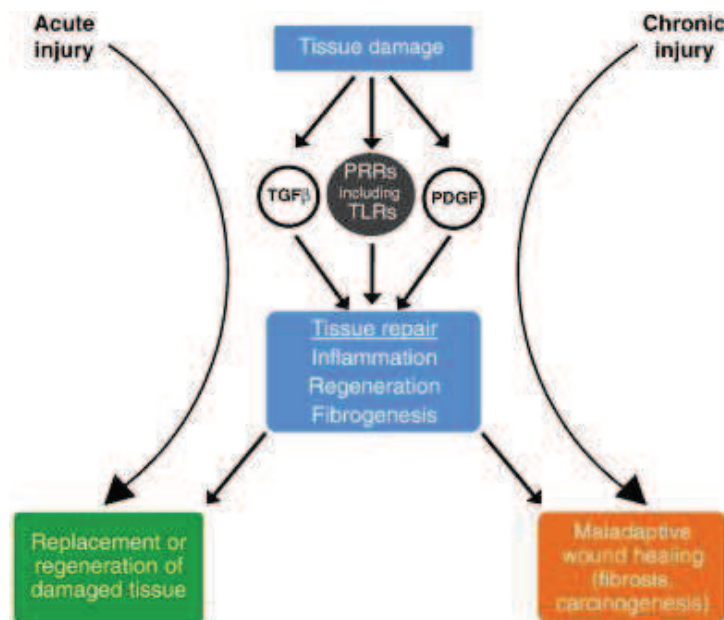


Figure 26 : Rôle central des PRRs dont les TLRs (Huebenera et Schwabea, 2012)

1.4.5 Induction des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Le **stress oxydant**, induit par une augmentation des **ROS** (l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles), est étroitement associé à la fibrose. Dans les cellules produisant du collagène, ROS agit comme un second messager (Bataller et Brenner, 2005).

Dans des fibroblastes, TGFβ active la NADPH oxydase NOX4 qui catalyse la réduction de l'oxygène en ROS (Hecker et coll., 2009). Le peroxyde d'hydrogène induit, ensuite, l'activation des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes. De plus, ce ROS semble nécessaire à l'action profibrosante de TGFβ (Hecker et coll., 2009). Des produits ciblant NOX4 préviennent ainsi la fibrose pulmonaire induite par la blémocycine chez la Souris (Hecker et coll., 2009).

1.4.6 Activation des cellules synthétisant le collagène

Peu après la phase inflammatoire initiale, les myofibroblastes synthétisent les composants de la MEC, et notamment le collagène. Ces myofibroblastes ont trois origines possibles (Figure 27) :

- classiquement, les **cellules mésenchymateuses résidentes** (dans le tissu) subissent une expansion sous l'influence de différents facteurs profibrosants (Hinz et coll., 2007) ;
- il est également possible que les cellules épithéliales se différencient en myofibroblastes, par un phénomène appelé **transition épithélio-mésenchymateuse** (Kalluri et Neilson 2003) ;
- enfin, les myofibroblastes peuvent provenir du recrutement des **fibrocytes circulants CD34+** (Bucala 1994), qui sont des précurseurs mésenchymateux circulants issus de la moelle osseuse.

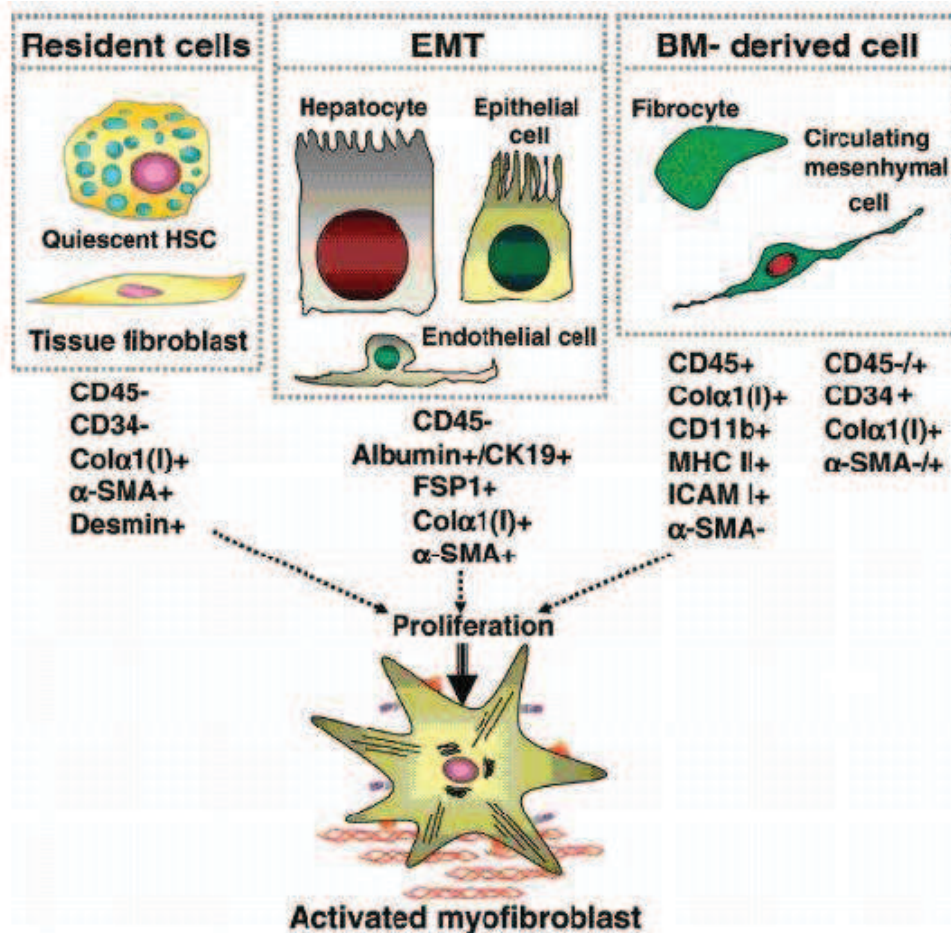


Figure 27 : Voies possibles d'activation des myofibroblastes (modifié à partir de Kisseleva 2008)

1.4.6.1 La voie des cellules résidentes

Dans le poumon, le foie, la peau et les reins, la **principale source de collagène** est le pool de cellules résidentes (fibroblastes/myofibroblastes). Les myofibroblastes résidents sont issus de fibroblastes de tissus spécifiques, qui sont activés et prolifèrent en réponse à une lésion. Les myofibroblastes se différencient à partir de la lignée mésenchymateuse et perdent les marqueurs lymphoïdes tels que CD45 ou CD34. En culture, mis en présence de $TGF\beta_1$ ou d'autres composants de la MEC (fibronectine, collagène I), les fibroblastes acquièrent rapidement un **phénotype myofibroblastique** (expression d' α SMA, actine qui confère des propriétés contractiles aux fibroblastes, production de collagènes I et III) (Kisseleva et Brenner, 2008).

1.4.6.2 La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Bien que la TEM ait été initialement décrite dans l'embryogenèse, des études récentes suggèrent qu'en réponse à une agression, l'épithélium peut contribuer à la fibrose en produisant des fibroblastes par le biais de la TEM.

La TEM joue également un rôle dans l'évolution tumorale, et en particulier dans l'acquisition d'un potentiel métastatique où les cellules tumorales développent des propriétés mésenchymateuses.

La **TEM** est le processus par lequel les **cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques** (perte de l'expression des protéines d'adhésion E-cadhérine, ZO-1, et β -caténine) et **développent un phénotype fibroblastique** (expression de **FSP-1**, protéines de la MEC, α -SMA ; motilité). Les cellules épithéliales peuvent ensuite migrer à travers la membrane basale jusqu'à l'interstitium où elles vont proliférer et acquérir un phénotype de **myofibroblastes** synthétisant les composants de la MEC (fibronectine et collagènes).

Il existe des différences importantes entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses. En effet, les cellules épithéliales sont intimement jointes entre elles, formant ainsi des couches de cellules polarisées et organisées. Au contraire, les cellules mésenchymateuses ne forment pas des couches organisées et ne sont pas polarisées. Elles sont très mobiles et présentent un aspect fusiforme, qui les apparente à des fibroblastes. Leur plasticité permet leur migration.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la TEM sont nombreux et encore mal compris. Néanmoins, il apparaît que le **$TGF\beta_1$** joue un rôle essentiel dans la progression de la TEM. D'autres facteurs tels qu'EGF, bFGF (facteur fibroblastique de croissance) ou l'IL-1 contribuent également à la TEM (Kalluri et Neilson, 2003) (**Figure 28**).

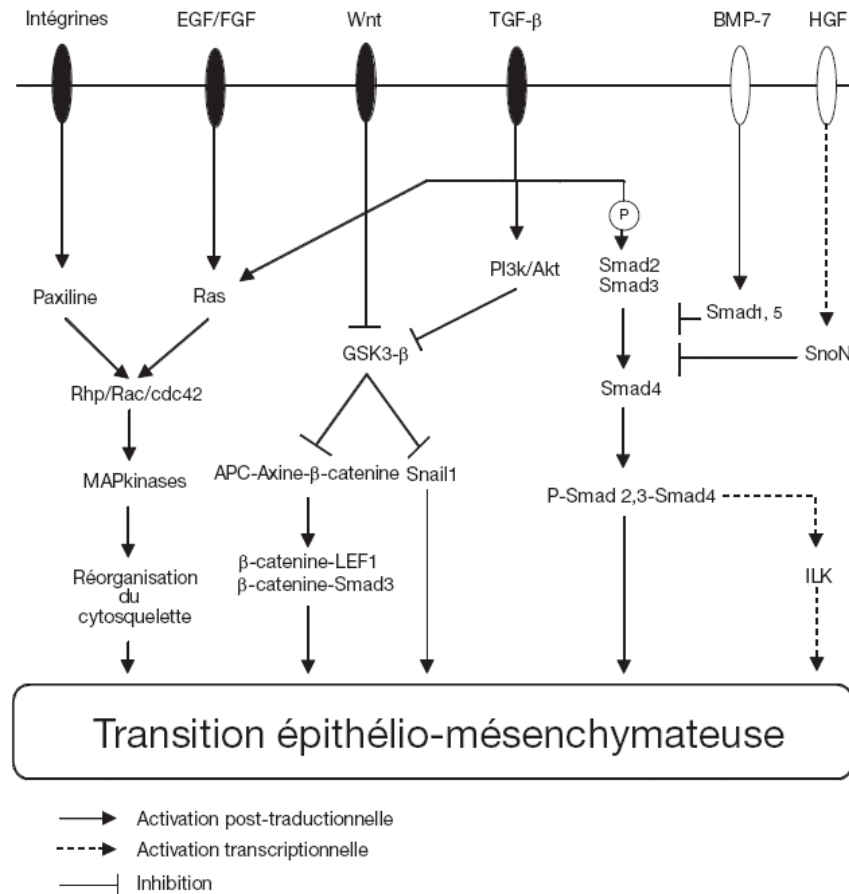


Figure 28 : Principales voies de signalisation impliquées dans la TEM (Pallet et Anglicheau 2008)

1.4.6.3 Les fibrocytes circulants

Identifiés par Bucala et ses collaborateurs (1994), les **fibrocytes** sont impliqués dans de nombreuses fibroses (Bucala, 2012). Ils peuvent être définis comme des « cellules souches adultes », capables de se différencier en cellules fonctionnelles. Ce sont des cellules circulantes issues de la moelle osseuse. Ils présentent à la fois les caractéristiques des cellules lymphoïdes et des fibroblastes. Ils expriment **CD34**, CD45 et le **collagène I**, ainsi que des récepteurs à des chimiokines tels que CCR3, CCR5, CXCR4, CCR7, et CCR2.

Suite à une agression tissulaire, les fibrocytes sont **recrutés et migrent** dans le sang jusqu'à l'organe lésé. Le nombre de fibrocytes dans les tissus fibrosés dépend de l'organe et du type d'agression.

Sous l'action de médiateurs tels que **TGFβ₁**, PDGF, IL-13, IL-4, SLC ou CXCL12, les fibrocytes prolifèrent et se **différencient par la suite en myofibroblastes**. Ils perdent au fur et à mesure de leur différenciation en myofibroblastes, leur marquage CD34 (**Figure 29**). L'endothéline-1 (ET-1) induit également la différenciation des fibrocytes en myofibroblastes (Bucala, 2012).

A l'inverse, les cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-12 et IFN-γ inhibent la maturation des précurseurs CD14+ en fibrocytes. De plus, le **SAP** (« sérum amyloïde P »), une glycoprotéine constituant tous les dépôts amyloïdes, est un inhibiteur clé de la différenciation des fibrocytes.

Il a également été récemment suggéré que la différenciation des fibrocytes puisse dépendre de l'activation des lymphocytes T CD4. En effet, ces derniers peuvent la favoriser ou, au contraire, la bloquer (Bucala, 2012).

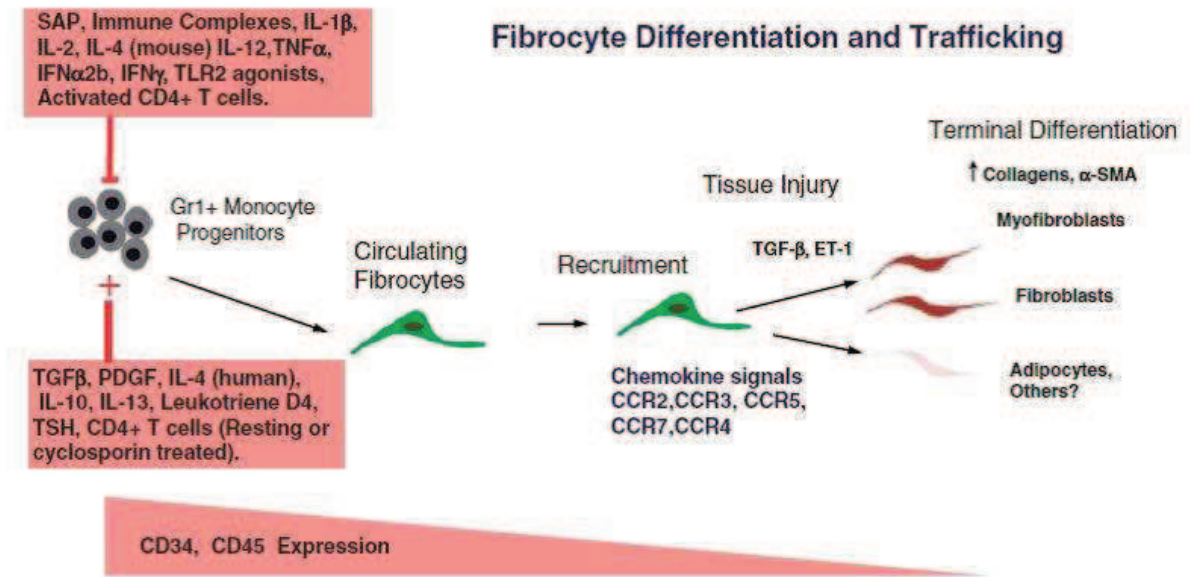


Figure 29 : Différenciation des fibrocytes (Bucala, 2012)

1.5 Stratégies anti-fibrosantes et cibles thérapeutiques

Il est essentiel de connaître les différentes voies impliquées dans les phénomènes de fibrose afin d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu et de mettre au point de nouveaux biomarqueurs pour suivre l'efficacité du traitement. Il existe de nombreuses cibles thérapeutiques potentielles, comme on l'a vu. Nous nous limiterons à détailler les stratégies les plus étudiées actuellement, principalement dans les sclérodermies et la fibrose pulmonaire (IPF).

✓ Le **TGFβ** étant un acteur clé dans la fibrose, il est, bien évidemment, essentiel de s'y intéresser (voir 1.4.2.1 TGFβ1). Des études précliniques et cliniques ont abouti à des résultats très encourageants sur de nombreuses fibroses après inhibition du TGFβ, qu'elle soit directe ou indirecte, par la voie des SMADs (Santiago et coll., 2005 ; Zhang et coll., 2010 ; Higashiyama et coll., 2007 ; Jinnin et coll., 2006 ; Pines et Nagler 1998).

Concernant les voies de signalisation non SMAD-dépendante, elles permettent de nombreuses possibilités. Les inhibiteurs de tyrosines kinases (comme l'imatinib, le dasatinib ou nilotinib) inhibent la tyrosine kinase C-Abl, et ont montré des effets anti-fibrosants en préclinique (Akhmetshina et coll., 2009 ; Shaker et coll., 2011). Cependant, ils ne sont pas sélectifs et présentent souvent une importante toxicité systémique (cf. paragraphe ci-dessous « PDGF »).

Néanmoins, le TGF β possède de nombreuses autres fonctions (comme nous l'avons vu, c'est notamment un puissant immunosuppresseur), qui expliquent que les souris KO pour ce facteur meurent rapidement après la naissance (Kulkarni et coll., 1993). Il est donc plus judicieux de ne pas agir directement sur TGF β , mais indirectement sur les voies de signalisation (dépendantes ou non des SMADs) par exemple, afin d'éviter des effets néfastes.

Le **Tableau 4** présente des exemples de médicaments déjà commercialisés présentant une activité inhibitrice de la signalisation TGF β . On notera que les indications cliniques ne concernent jamais directement la fibrose. D'autres molécules ont des effets anti-TGF β mais le mécanisme est mal connu ; c'est notamment le cas de pirféridone (Schaefer et coll., 2011).

Tableau 4 : Médicaments présentant des propriétés anti-TGF β sur le marché, et indications cliniques (Varga et Pasche, 2009)

Drug	Clinical indication	Putative anti-TGF- β mechanism
Losartan	Hypertension	Blocks angiotensin-II-mediated induction of TGF- β ; reduces levels of TGF- β
HMG-CoA reductase inhibitors (statins)	Hypercholesterolemia	Blocks TGF- β stimulation of collagen synthesis
Endothelin-1 blockers (bosentan, ambrisentan)	Pulmonary hypertension	Blocks TGF- β signaling
Imatinib mesylate and related kinase inhibitors (dasatinib, nilotinib)	CML, GIST	Blocks SMAD-independent TGF- β signaling, activates PDGF receptors
PPAR- γ ligands, (rosiglitazone, pioglitazone)	Type 2 diabetes	Disrupts intracellular TGF- β –SMAD signal transduction
Tranilast (approved in Japan)	Allergy, keloid, hypertrophic scars	Inhibits TGF- β secretion and activity
Paclitaxel	Cancer	Microtubule stabilization; blocks SMAD activation and SMAD-dependent responses

Abbreviations: CML, chronic myelogenous leukemia; GIST, gastrointestinal stromal tumor; PDGF, platelet-derived growth factor; PPAR- γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; TGF- β , transforming growth factor β .

La voie de signalisation de TGF β peut être inhibée de différentes manières (**Figure 30**) :

- En bloquant l'activation du TGF β à partir du TGF β latent ;
- En piégeant le ligand par un récepteur soluble, un anticorps neutralisant, des peptides inhibiteurs ;
- En inhibant les récepteurs avec des inhibiteurs de kinase T β RI ou T β RII ;
- En bloquant la translation de l'ARNm de TGF β avec des oligonucléotides antisens.

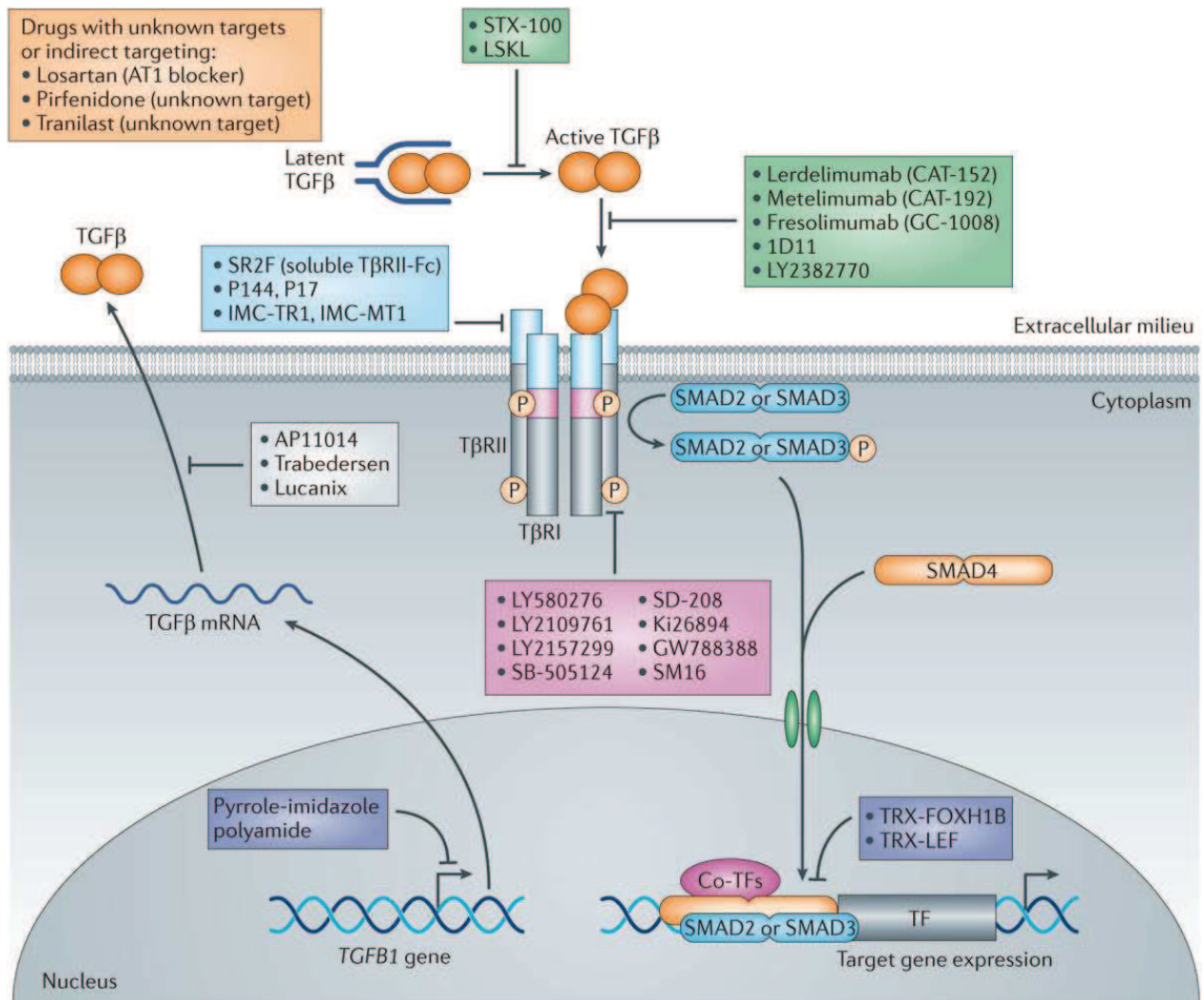


Figure 30 : Représentation schématique des différentes approches thérapeutiques associées à l'inhibition de la voie du TGFβ (Akhurst et Hata, 2012).

✓ Les agonistes de **PPAR-γ** régulent les réponses fibrosantes induites par TGFβ (Ghosh et coll., 2004) (voir 1.4.4.6 PPAR-γ). L'activation de PPARγ par des ligands agonistes synthétiques ou naturels permettrait de prévenir ou de traiter la fibrose, sur la base d'études précliniques (Wei et coll., 2012). Cependant, toutes les glitazones ont été retirées du marché français. La pioglitazone (Actos®) a été retirée du marché en Juin 2011 pour une suspicion de risque accru de cancer de la vessie. La rosiglitazone (Avandia®) a également été retirée du marché en Septembre 2010 (pour une suspicion d'augmentation du risque cardiovasculaire). Enfin, la troglitazone (Resulin®/Rezulin®) a été retirée en 1997 (marché britannique) et 2000 (Etats-Unis) après la survenue d'insuffisances hépatiques aiguës. D'autres ligands de PPARγ plus spécifiques et apparemment moins toxiques (tels que le CDDO) sont en cours d'étude.

✓ Le **CTGF** est un important facteur pro-fibrosant (voir 1.4.2.2 CTGF), de par ses effets dépendants ou non du TGFβ. Il pourrait donc être une voie d'étude très pertinente. Le blocage du CTGF sur différents modèles précliniques améliore la fibrose (Booth et coll.,

2010 ; Ikawa et coll., 2008 ; Le Maire et coll., 2010). Un anticorps anti-CTGF, le FG-3019, développé par la société FibroGen, est actuellement en étude clinique de phase 2 dans la FPI.

✓ La voie du **PDGF** semble être aussi une cible potentiellement judicieuse (voir 1.4.2.3 PDGF). Ainsi, l'imatinib (Glivec®) a déjà montré des effets favorables sur certaines fibroses (Bueso-Ramos et coll., 2004 ; Patterson et coll., 2006 ; Prey et coll., 2012 ; Van Daele et coll., 2008). Le mécanisme des effets anti-fibrosants de cette molécule reste peu clair puisqu'elle n'est pas spécifique d'une seule voie. En effet, elle inhibe les récepteurs PDGFR α et β , C-KIT ainsi que la tyrosine kinase C-Abl (impliquée dans la voie de TGF β SMAD-indépendante). L'imatinib agit également sur la voie de Fli1, en inhibant C-Abl (**Figure 31**).

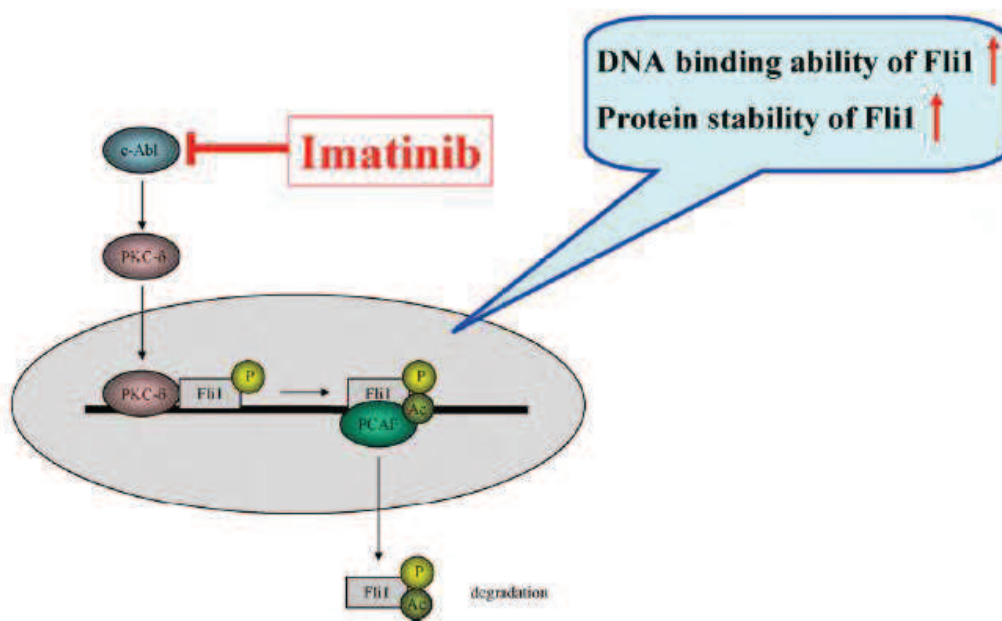


Figure 31 : Effet de l'imatinib sur la voie Fli1 (Asano et coll., 2010)

Enfin, comme d'autres inhibiteurs de tyrosine kinases, l'imatinib peut induire une toxicité cardiaque (Mellor et coll., 2011.), qui en rend le maniement délicat.

✓ **L'acide lysophosphatidique LPA et son récepteur LPA₁** contribueraient à la fibrose dans de multiples tissus, tels que les poumons, la peau, le péritoine, le foie ou les reins (Tager, 2012) (voir 1.4.4.14 Acide lysophosphatidique). La voie du LPA semble donc être une cible thérapeutique intéressante pour les patients souffrant de fibrose systémique. Plusieurs études cliniques sont en cours afin d'étudier des antagonistes des récepteurs au LPA (**Tableau 5**).

**Tableau 5 : Etudes cliniques en cours investiguant des antagonistes des récepteurs au LPA
(d'après Tager, 2012)**

Companie	Molécule	Récepteur	Indication
Bristol-Myers Squibb	BMS-986202	LPA ₁	IPF
Sanofi	SAR100842	LPA ₁ , LPA ₃	Sclerodermie

✓ **Egr-1** est impliqué dans le mécanisme de nombreuses fibroses humaines (Bhattacharyya et coll., 2011a), il pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante (voir 1.4.4.7 Early growth responses (Egr)). Plusieurs médicaments utilisés en clinique inhibent fortement l'induction ou l'activité d'Egr-1. Il s'agit notamment du mycophénolate mofétil, de la ciclosporine, la simvastatine, de l'imatinib et enfin des ligands PPAR γ (Bea et coll., 2003 ; Bhattacharyya et coll., 2008 ; Farivar et coll., 2005 ; Okada et coll., 2002 ; Wu et coll., 2009b) De plus, certains de ces agents ont déjà montré leur efficacité dans des modèles précliniques de fibrose, et pourraient être candidats au traitement de la SSc ou celui de la fibrose pulmonaire idiopatique (FPI) (Bhattacharyya et coll., 2011a).

✓ Le rôle des macrophages a été largement décrit dans le mécanisme de la fibrose (Homer et coll., 2011 ; Wynn et Barron, 2010) (voir notamment la section 1.4.3 Recrutement des cellules inflammatoires). Il serait intéressant d'agir directement sur la **phase inflammatoire** en inhibant le recrutement des cellules inflammatoires, et notamment des macrophages. Cependant, il ne faut pas oublier que les macrophages M1 (réponse TH1) ont aussi un rôle protecteur dans les fibroses. Il serait donc judicieux d'identifier le ou les type(s) de macrophages impliqués dans la fibrose. Comme nous l'avons vu, les macrophages de phénotype M1 ont plutôt un rôle pro-inflammatoire en synthétisant des cytokines telles que le TNF α ou l'IL-1 β . A l'inverse, les macrophages de phénotype M2 sont « anti-inflammatoires », mais ils synthétisent néanmoins des cytokines pro-fibrosantes telles que le TGF β , le PDGF et le CTGF. Le blocage de la chimiokine **MCP-1** (souris KO/MCP-1) permet de réduire le recrutement des macrophages et d'inhiber la fibrose cutanée (induite par la bléomycine) (Ferreira et coll., 2006). MCP-1 pourrait aussi influencer la formation de fibres de collagène *in vivo*.

✓ **L'endothéline ET-1** est aussi un acteur de la fibrose (voir 1.4.4.4 Endothéline-1). Le bosentan, inhibiteur peu spécifique, n'a pas provoqué d'amélioration significative des symptômes chez des patients sclérodermiques ou souffrant de fibrose pulmonaire. Cette absence d'efficacité clinique pourrait peut-être s'expliquer par l'absence de sélectivité du bosentan vis-à-vis du récepteur ET_A (Shetty et Derk, 2011).

✓ **L'angiotensine II** présente aussi un rôle dans la fibrose, principalement rénale (voir 1.4.4.2 Angiotensine II). Des études précliniques ont montré l'intérêt de bloquer le système rénine-angiotensine dans cette pathologie (Boffa et coll., 2003 ; Remuzzi et coll., 2002).

Actuellement, la prise en charge de la sclérodermie systémique repose surtout sur le traitement des atteintes viscérales (document HAS de 2009). Il n'y a pas de traitement anti-fibrosant reconnu car aucun produit n'a montré son efficacité clinique. Il n'existe également aucun traitement global agissant simultanément sur chacun des différents mécanismes pathogéniques de la SSc. Il s'agit donc de traitements symptomatiques. La majorité des traitements pharmacologiques recommandés par la HAS ne présentent pas d'autorisation de mise sur le marché pour cette indication. Les immunosuppresseurs peuvent être proposés comme traitement de fond. En effet, le cyclophosphamide (Endoxan[®]) a montré des effets favorables chez des patients souffrant de fibrose pulmonaire due à la SSc (Tashkin et coll., 2006).

En ce qui concerne la FPI, le traitement reconnu (avec une AMM) est un immunosuppresseur, la pirféridone (HAS 2012).

1.6 Conclusion

Nous avons décrit les principaux acteurs impliqués dans le mécanisme des fibroses. La liste en est copieuse. Elle n'est cependant pas exhaustive et des travaux, qui proposent de nouveaux acteurs, paraissent régulièrement. En fonction de l'organe, les acteurs et les mécanismes impliqués peuvent être différents, il n'y a donc **pas de mécanisme « unitaire »**, ce qui complexifie considérablement la compréhension des fibroses. De plus, dans certains cas, la fibrose est **systémique**, comme pour la **fibrose systémique néphrogénique** (fibrose cutanée, du myocarde, pulmonaire, au niveau muscle diaphragmatique...). Néanmoins, il apparaît que les principaux acteurs décrits sont impliqués dans les principales pathologies associées à une fibrose. C'est notamment le cas du **TGF β** , qui est la « pierre angulaire » de la fibrose. Par ailleurs, il faut souligner qu'il interagit avec de nombreuses autres voies de signalisation (telles que CTGF, PDGF, PPAR γ , etc.). Une meilleure compréhension du rôle des différents acteurs clés impliqués devrait donc permettre de progresser dans la prise en charge thérapeutique des patients.

Chapitre 2 : LES COMPLEXES DE GADOLINIUM

2.1 Introduction

L'**IRM** est une méthode d'imagerie médicale récente qui permet d'acquérir des images anatomiques en deux ou trois dimensions, avec une **excellente résolution** et avec des temps d'acquisition acceptables par rapport à un examen clinique. L'IRM permet également d'obtenir un excellent contraste entre les différents tissus mous par exemple. Elle a l'avantage de ne pas être irradiante (contrairement au scanner ou à la médecine nucléaire), elle n'est donc **pas invasive**.

C'est bien évidemment un important outil diagnostique, mais elle aide également à la décision thérapeutique et au suivi de l'efficacité d'un traitement.

L'**IRM anatomique** (ou structurelle) permet de visualiser la structure anatomique d'un organe et permet, par exemple, de visualiser des tumeurs ou de localiser certaines malformations. L'IRM permet aussi d'effectuer de l'**imagerie fonctionnelle**, afin d'étudier la fonction ou l'activité d'un organe.

2.2 Principe de l'IRM

L'IRM fait appel au phénomène de **Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**.

Le noyau de l'atome est constitué de **nucléons** (neutrons et protons) qui sont naturellement animés d'un mouvement de **rotation axiale**, nommé mouvement de précession ou « **spin** » (en anglais, « to spin » signifie tourner sur soi-même) et qui est représenté par un **vecteur S**. Toute charge en rotation induit, autour d'elle, un champ magnétique, nommé **moment magnétique (Figure 32)**. Le proton et le neutron possèdent chacun un moment magnétique (lié au spin).

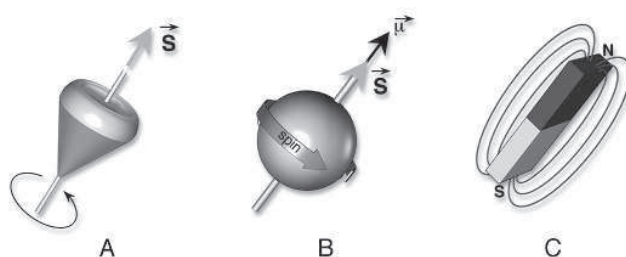


Figure 32 : Notion de moment cinétique et magnétique (site internet 2) :

- (A) Une particule qui tourne induit autour d'elle un moment cinétique ou « spin » aligné sur son axe de rotation représenté par un vecteur S.
- (B) Les protons sont animés d'un mouvement de rotation (comme une toupie) et de plus portent une charge positive. Une charge qui tourne induit autour d'elle un champ magnétique appelé moment magnétique, représenté par un vecteur d'aimantation « microscopique » noté μ .
- (C) Les protons peuvent donc être assimilés à de petits aimants avec un pôle nord (N) et un pôle sud (S).

Cependant, les protons et les neutrons ont tendance à s'apparier, annulant ainsi, leurs moments magnétiques. Seuls les atomes présentant **un nombre impair de nucléons**, et donc

ayant un nucléon non apparié sur leur couche externe, ont des propriétés magnétiques (c'est-à-dire un moment magnétique intrinsèque, représenté par un **vecteur μ**), exploitables en RMN. C'est, notamment, le cas de l'**hydrogène**, formé d'un seul proton, qui est particulièrement intéressant en IRM puisqu'il représente l'immense majorité des atomes de l'organisme (constituant des molécules d'eau et de graisse).

En l'absence d'un champ magnétique externe, les moments magnétiques μ des noyaux d'hydrogène ont tendance à s'orienter de façon aléatoire (**Figure 33**). La somme des moments magnétiques μ est donc nulle. Au contraire, **soumis à un champ magnétique extérieur B_0** (présent dans le tunnel IRM), les moments magnétiques μ s'orientent en fonction du champ B_0 (**Figure 33**). Deux orientations sont alors possibles :

- Le proton peut s'orienter dans le sens du champ B_0 et donc **parallèlement** à celui-ci, ce qui correspond à un niveau de **basse énergie E_1** .
- A l'inverse, le proton peut s'orienter dans le sens contraire à B_0 (**antiparallèle**), ce qui correspond à un niveau de **haute énergie E_2** .

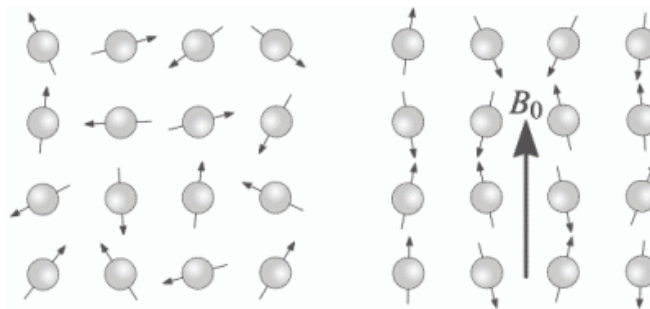


Figure 33 : Orientation des protons (site internet 3) :

En l'absence d'un champ externe, les protons sont orientés de façon aléatoire en tous sens. Soumis à un champ magnétique, les protons s'orientent dans la direction de B_0 .

La répartition des protons est à quasiment **équivalente** mais il y a légèrement **plus de protons parallèles** (**Figure 34**).

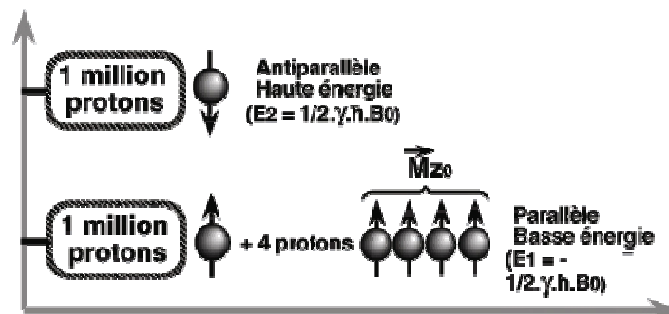


Figure 34 : Répartition des protons dans le plan parallèle ou antiparallèle sous un champ magnétique B_0 de 0,5 Tesla (Kastler et coll., 1994)

Cette différence est extrêmement faible, mais elle suffit à induire une aimantation macroscopique (représentée par un **vecteur M**), colinéaire au champ magnétique B_0 . Le

nombre de protons parallèles en excès dépend du champ magnétique B_0 . Par exemple, pour un champ magnétique de 0,5 Tesla et à la température corporelle, pour 2 millions de protons, 1 million de protons sont orientés dans le plan antiparallèle et 1 million + **4 protons** sont orientés dans le plan parallèle au champ B_0 (le plan de plus faible énergie). Ces **4 protons parallèles** en excès vont permettre l'apparition du **vecteur M** (Figure 34).

A l'équilibre, ce vecteur M est aligné sur B_0 selon O_z ($M_z = M$), sans composante transversale (plan xO_y , perpendiculaire à O_z ; $M_{xy} = 0$) (Figure 35). En fait, les protons qui composent le vecteur M ne sont pas parfaitement alignés sur B_0 , ils tournent autour de l'axe du champ magnétique B_0 avec un angle donné, en décrivant un cône (mouvement de précession). Cette rotation peut être assimilée à une toupie qui tourne sur elle-même, la fréquence de cette oscillation dépendant du champ magnétique (Figure 36).

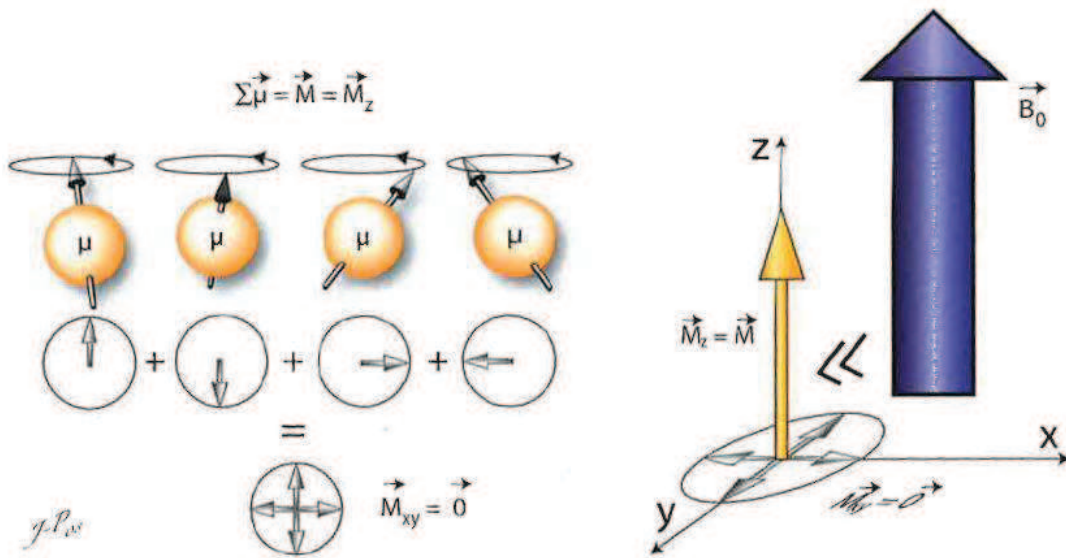


Figure 35 : Caractéristiques vectorielles de l'aimantation microscopique (μ) et macroscopique (M) (Dillenseger et Moerschel, 2009)

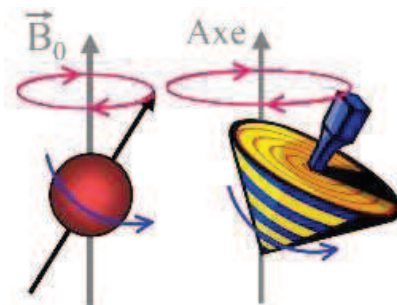


Figure 36 : Soumis à un champ magnétique B_0 , chaque proton décrit un cône autour de B_0 , comme le ferait une toupie (site internet 3).

A ce stade, la mesure de l'aimantation macroscopique de M est impossible car elle s'aligne avec le champ B_0 et elle n'est pas directement détectable. Il est donc nécessaire de modifier son orientation et de lui apporter une composante transversale (M_{xy}) afin de pouvoir détecter, par la suite, son retour à l'équilibre. Cette bascule s'effectue par un apport

d'énergie externe. Une **onde de radiofréquence RF** (champ magnétique tournant ; vecteur B_1), de même fréquence que celle de précession des protons qui composent le vecteur d'aimantation M , est ainsi appliquée dans une direction perpendiculaire à B_0 . L'effet d'une application d'une onde de RF peut être étudié selon deux approches : le modèle quantique et le modèle « classique ».

D'un point de vue quantique, cette onde RF induit des **transitions** entre les deux niveaux d'énergie ($E_1 \rightarrow E_2$). Les protons passent ainsi progressivement du niveau parallèle à antiparallèle. Le nombre de protons passant au niveau d'énergie supérieur dépend de l'intensité de l'onde de radiofréquence appliquée et de sa durée d'application. Par exemple, lorsque la moitié des protons sont passés au niveau de haute énergie E_2 , cela correspond à une onde de RF de 90° (**Figure 37**). Lorsqu'ils sont tous passés au niveau E_2 , l'onde de RF appliquée correspond à un basculement de 180° .

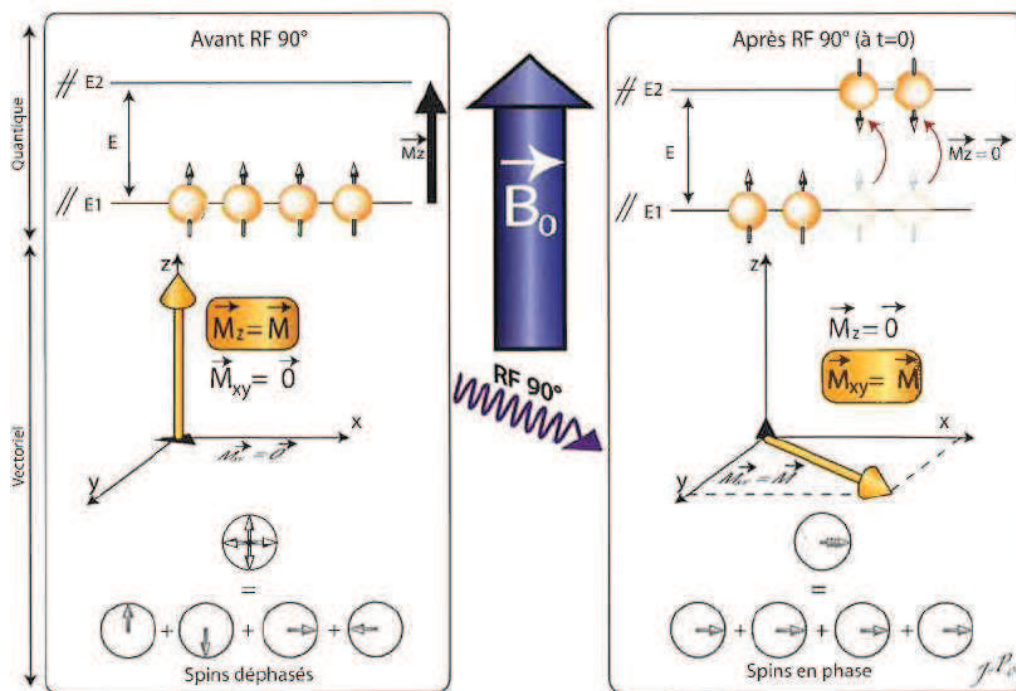


Figure 37 : Effet d'une impulsion RF de 90° sur le vecteur d'aimantation macroscopique M et sur les transitions d'énergie des spins (Dillenseger et Moerschel, 2009)

D'un point de vue vectoriel, l'onde RF permet de basculer M de sa position d'équilibre dans un plan transversal et donc bien distinct de B_0 . Les aimantations microscopiques μ se mettent alors **en phase** et apparaît ainsi une **aimantation transversale M_{xy}** (**Figure 37**). Cette bascule de M n'est pas complètement linéaire, elle est accompagnée d'un mouvement de précession de M autour de B_0 . Lorsque l'intégralité de M est dans le plan transversal ($M_{xy} = M$), M a subi une impulsion RF de 90° (**Figure 37**).

A l'arrêt de l'onde de RF, l'aimantation macroscopique M retourne à son état d'équilibre initial. Des phénomènes de **relaxations** vont ainsi avoir lieu.

L'aimantation longitudinale M_z (projection de M dans le plan Oz) (colinéaire à B_0) va revenir progressivement à sa position d'équilibre, avec une constante de temps caractéristique T_1 nommé **temps de relaxation longitudinale** (exprimé en secondes) (**Figure 38**). Le temps T_1 dépend de la vitesse à laquelle le proton excité a rendu son énergie et émis un signal.

De même, l'aimantation transversale M_{xy} (projection de M dans le plan xOy) (dans le plan perpendiculaire à B_0), créée à la suite du basculement de l'aimantation, va disparaître progressivement (dû aux déphasages progressifs des spins) avec une constante de temps T_2 appelé **temps de relaxation transversale** (exprimé en secondes) (**Figure 39**). Le temps de relaxation T_2 dépend, quant à lui, de la vitesse à laquelle les protons se sont déphasés entre eux.

Ces phénomènes de relaxation sont à l'origine du signal détecté en IRM.

Le temps de relaxation T_1 est plus long que le temps de relaxation T_2 . Ces deux temps T_1 et T_2 sont propres à chaque type de tissu. Par exemple, le T_1 et le T_2 de l'eau sont longs alors que dans la graisse, le T_1 et le T_2 sont significativement plus courts que ceux de l'eau.

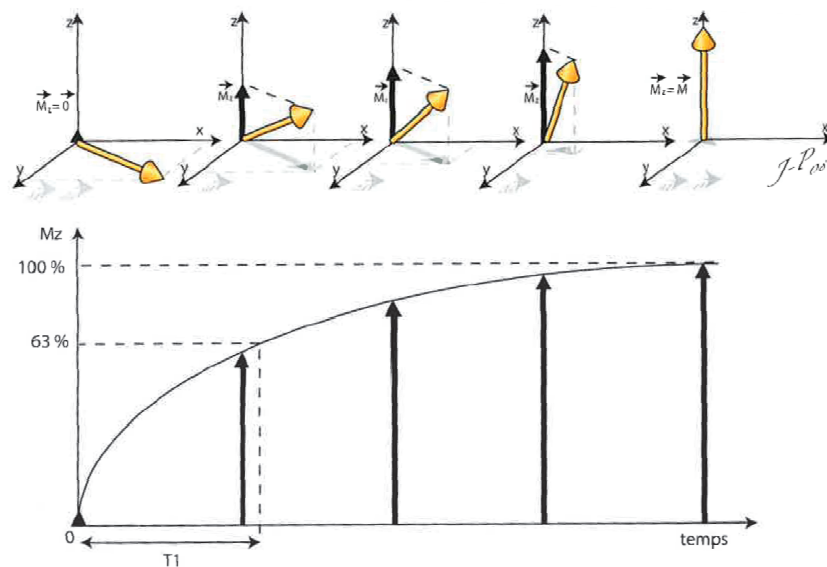


Figure 38 : Relaxation T_1 , repousse de l'aimantation longitudinale (Dillenseger et Moerschel, 2009)

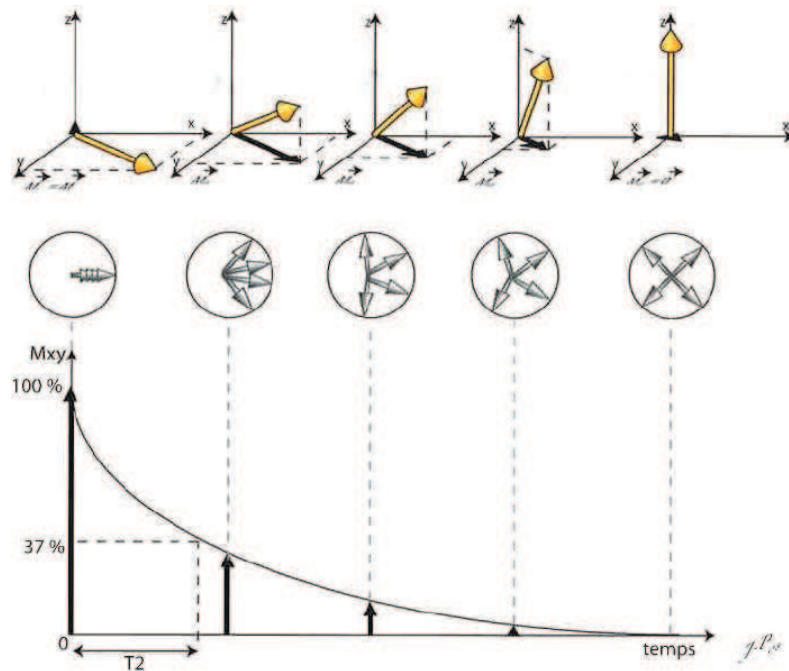
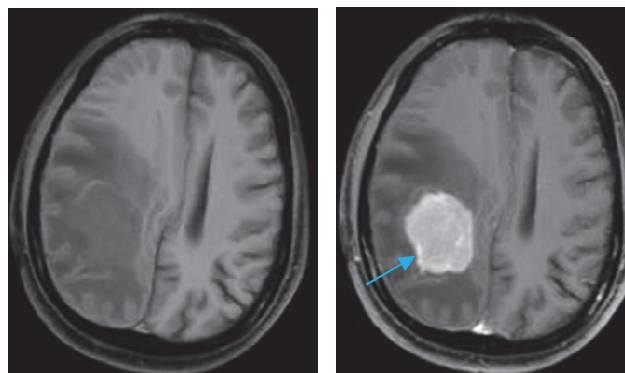


Figure 39 : Relaxation T2, Décroissance de l'aimantation transversale (Dillenseger et Moerschel, 2009)

2.3 Utilisation d'un agent de contraste en IRM

Les temps de relaxation des tissus biologiques diamagnétiques, responsables du contraste entre les structures, peuvent être manipulés grâce à des agents de contraste qui ont des propriétés paramagnétiques ou superparamagnétiques.

En effet, le contraste entre les tissus n'est pas toujours suffisant pour permettre la différenciation nette des structures d'intérêt. Les agents de contraste utilisés en IRM permettent ainsi d'améliorer le contraste et de mieux visualiser et caractériser, par exemple, les micro-vaisseaux, les ganglions ou de distinguer certaines tumeurs (exemple **Figure 40**). Le gadolinium (Gd) ayant des propriétés paramagnétiques (c'est-à-dire qu'il acquiert une aimantation du champ magnétique auquel il est soumis), les **complexes de gadolinium (CGs)** sont largement utilisés comme agents de contraste en IRM.



Pré-injection

Post-injection

Figure 40 : Coupes IRM axiales du cerveau pondérées en T1, avant (pré) et après (post) injection d'acide gadotérique. Détection d'un lymphome (→) (Source : images internes Guerbet)

2.4 Gadolinium et autres lanthanides

Le **Gd** (numéro atomique $Z = 64$; masse molaire $M = 157,25$) est un élément de la famille des **lanthanides**. Cette famille est composée de 15 éléments allant du lanthane ($Z = 57$) au lutécium ($Z = 71$) (**Tableau 6**). Le terme « **terres rares** » a longtemps été utilisé pour désigner ces éléments ainsi que l'yttrium ($Z = 39$) et le scandium ($Z = 21$), deux métaux possédant de nombreuses propriétés chimiques communes aux lanthanides (Cotton, 1991). Cependant, certains de ces métaux (comme le cérium) n'étant pas rares dans l'environnement, ce terme a été abandonné. Les lanthanides n'ont pas de rôle connu chez les organismes vivants.

Tableau 6: Lanthanides (d'après Palinkas, 2012)

Lanthanides	Symbole	Numéro atomique	Rayon ionique
Lanthane	La	57	1,17
Cérium	Ce	58	1,15
Praséodyme	Pr	59	1,13
Néodyme	Nd	60	1,12
Prométhium	Pm	61	1,11
Samarium	Sm	62	1,10
Europium	Eu	63	1,09
Gadolinium	Gd	64	1,08
Terbium	Tb	65	1,06
Dysprosium	Dy	66	1,05
Holmium	Ho	67	1,04
Erbium	Er	68	1,03
Thulium	Tm	69	1,02
Ytterbium	Yb	70	1,01
Lutécium	Lu	71	1,00

Les lanthanides sont souvent sous la **forme d'oxydation 3+**, même si certains lanthanides peuvent exister au degré d'oxydation 2+ (Eu et Sm) ou 4+ (Ce).

Tous les ions lanthanides (Ln^{3+}), à l'exception du La^{3+} et du Lu^{3+} ont des propriétés **paramagnétiques**, car ils possèdent des **électrons non appariés**. Le Gd^{3+} est particulièrement intéressant car il présente **sept** électrons célibataires, ce qui lui confère un moment magnétique élevé. De plus, sa symétrie orbitale lui permet d'avoir un **temps de relaxation électronique long** ($T_1 > 10^{-9}$ s) en comparaison aux autres lanthanides (environ 10^{-13} s pour Eu^{3+} , Yb^{3+} et Dy^{3+}) (Sessler et coll., 1993). Ces deux propriétés sont à l'origine d'un couplage dipolaire efficace entre le moment magnétique du Gd^{3+} et le moment magnétique des protons l'environnant, qui induit une **augmentation de la vitesse de relaxation des protons** (R_1 et R_2 , définis comme l'inverse des temps de relaxation T_1 et T_2 , respectivement).

Cependant, la **toxicité du gadolinium libre est bien connue** (Idée et coll., 2006 ; Spencer et coll., 1997). Le rayon ionique de Gd^{3+} (107,8 pm) est proche de celui de Ca^{2+} (114 pm), ce qui explique en partie sa capacité à bloquer les canaux Ca^{2+} voltage-dépendant. De nombreux effets du gadolinium s'expliquent par sa capacité à interférer avec des mécanismes calcium-dépendants. Il peut ainsi inhiber la contraction musculaire, la coagulation sanguine ou la transmission de l'influx nerveux (Biagi et Enyeart, 1990 ; Evans, 1990 ; Lansman, 1990). Il déprime le **système réticulo-endothélial** (Evans, 1990) principalement les cellules de Küpffer, inhibant ainsi la phagocytose (Husztik et coll., 1980). Cet effet est largement utilisé dans les études nécessitant un blocage des capacités macrophagiques du foie (Hardonk et coll., 1992 ; Kamei et coll., 1990). Il inhibe également l'activité de certaines enzymes (certaines déshydrogénases, l'adénosine triphosphatase (ATPase) calcium-dépendante, certaines kinases, les glutathion-S-transférases) et il augmente l'expression de cytokines hépatiques et de facteurs de transcription de certaines cytokines (gènes c-Jun; C/EBP-beta; C/EBP-delta) (Rai et coll., 1996).

Le gadolinium est donc administré sous forme **complexée** par un **ligand polyamino-polycarboxylique** ; la complexation réduit fortement sa toxicité.

Néanmoins, le Gd^{3+} « libre » possède au maximum **9 sites de coordination** (un site de coordination étant un site susceptible de former une liaison avec un atome donneur d'électrons) qui lui permettent d'interagir avec des molécules d'eau en solution. Dans le cas des CGs utilisés en imagerie, le ligand se lie généralement à 8 de ces sites. Par conséquent, seul **un site de coordination** est libre, sur lequel peut donc se lier une seule molécule d'eau (par liaison électrostatique entre le Gd et un des doublets d'électrons non appariés de l'oxygène de la molécule d'eau).

2.5 Mode d'action

Contrairement aux autres produits de contraste utilisés en imagerie médicale (PCI en imagerie RX, microbulles en imagerie par ultrasons, traceurs radioactifs en médecine nucléaire), les produits de contraste à base de gadolinium, utilisés en IRM, ont un **mode d'action indirect**. En effet, en IRM, c'est l'effet du Gd sur les protons environnants qui est responsable du contraste. En effet, les CGs induisent un **raccourcissement des temps de relaxation** longitudinal (T_1) et transversal (T_2) (**Figure 41**), par interaction entre le spin électronique du CG et le spin nucléaire des noyaux d'hydrogène situés à sa proximité.

Le Gd raccourcit **majoritairement le temps de relaxation longitudinal T_1** (rapport r_2/r_1 proche de 1), il a donc un effet T_1 prédominant et entraîne, par conséquent, un rehaussement du signal d'images pondérées en T_1 (on parle d'« hypersignal »). Plus le T_1 est court et plus le signal recueilli est important.

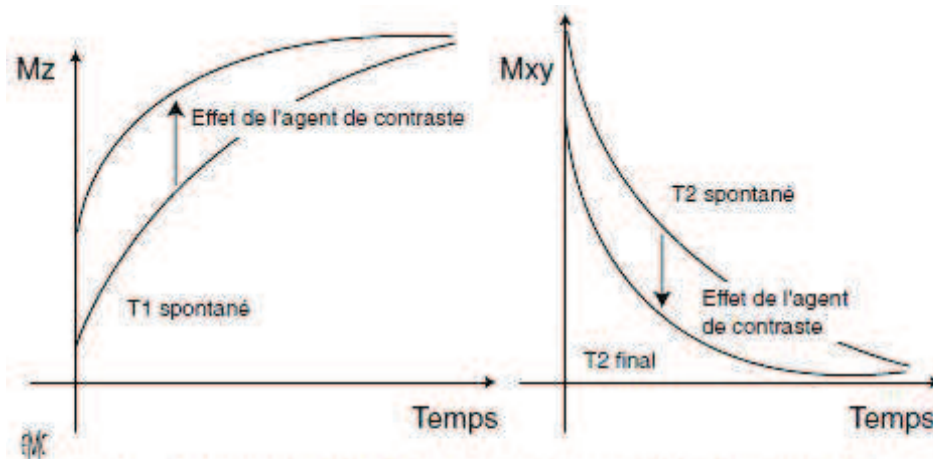


Figure 41 : Effets T1 et T2 des agents de contraste (Laurent et coll., 2009)

La contribution principale de la relaxation paramagnétique des protons de l'eau provient des interactions entre le moment cinétique (« spin ») nucléaire des protons de l'eau et le « spin » électronique S du gadolinium, comme cité précédemment. Deux mécanismes sont mis en jeu lors de ce phénomène (Figure 42) :

- le **mécanisme de « sphère interne »** qui concerne les molécules d'eau se trouvant dans la première sphère de coordination du Gd^{3+} (au plus proche de celui-ci) ;
- le **mécanisme de « sphère externe »** dépend du mouvement des molécules d'eau et de leur distance.

L'efficacité du CG est donc la somme de ces deux contributions (Laurent et coll., 2009).

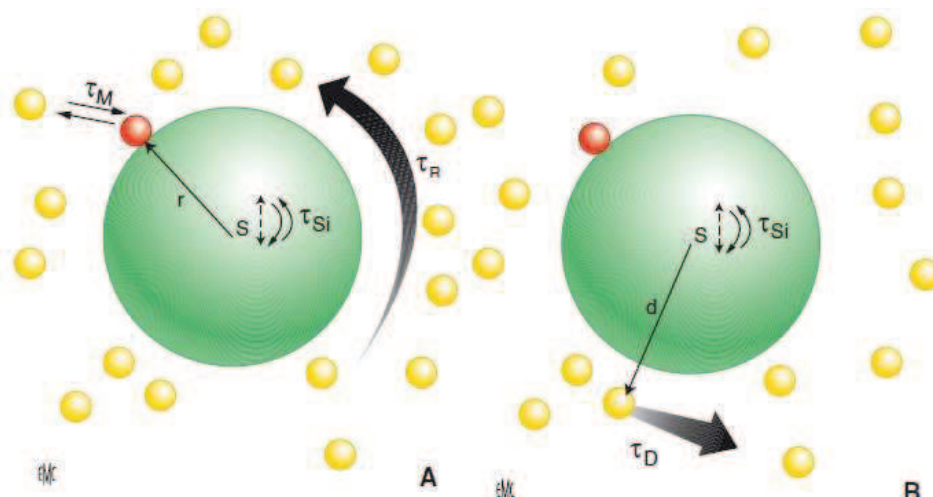


Figure 42 : Mécanisme de la sphère interne (A) et de la sphère externe (B) (Laurent et coll., 2009)

Différents paramètres influencent le mécanisme de sphère interne :

- le **nombre de molécules d'eau (q)** pouvant se lier au Gd^{3+} . Dans le cas des CGs actuellement commercialisés, une seule molécule d'eau se lie ($q = 1$) ;
- le **temps de corrélation rotationnelle** du complexe τ_R . L'objectif est d'augmenter cette valeur pour améliorer la relaxivité, en augmentant soit la masse moléculaire du

complexe intrinsèque soit sa capacité à se lier de manière non covalente à des macromolécules présentes dans le milieu ;

- la durée de vie (**temps de résidence τ_M**) de la molécule coordonnée en première sphère ; τ_M correspond au temps d'échange entre la molécule d'eau liée en première sphère et une molécule d'eau présente dans le milieu. Pour les agents couramment utilisés en clinique, plus τ_M est grand et moins le système relaxera vite sous l'action du Gd^{3+} . Il est donc important d'avoir un échange rapide et donc un τ_M court ;
- le **temps de relaxation électronique τ_s** .

2.6 Catégories structurales des complexes de gadolinium

La classification chimique des CGs dépend de la structure du ligand utilisé pour complexer le gadolinium car le ligand utilisé n'est jamais identique.

Il existe quatre types de complexes : les **molécules macrocycliques** pour lesquelles le Gd est « encagé » dans le ligand (acide gadotérique, Dotarem[®] ; gadotéridol, ProHance[®] ; gadobutrol, Gadovist[®]) et les **molécules linéaires** où le Gd est complexé par un ligand linéaire, « ouvert » (gadodiamide, Omniscan[®] ; acide gadopentétique de méglumine, Magnevist[®] ; gadoversétamide, OptiMARK[®] ; acide gadobénique, MultiHance[®] ; acide gadoxétique, Primovist[®] ; gadofosveset, Vasovist[®]) (Port et coll., 2008).

Dans les deux cas, la molécule peut être **ionique**, et donc salifiée par la méglumine (acide gadotérique ; acide gadobénique ; acide gadopentétique) ou par le sodium (acide gadoxétique ; gadofosveset) afin de neutraliser les charges négatives, ou **non ionique** (ou « neutre »). Dans ce dernier cas, le nombre de fonctions acides carboxyliques est réduit à trois, qui neutralisent les trois charges positives du Gd^{3+} .

Les différentes catégories structurales de CGs apparaissent dans la **Figure 43** ci-dessous.

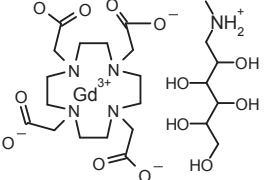
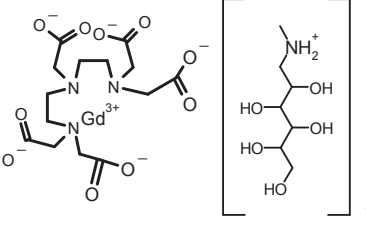
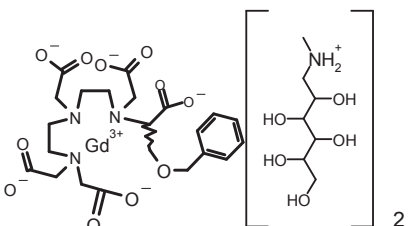
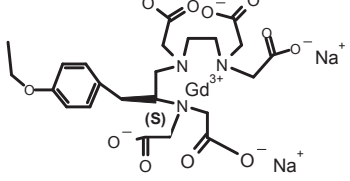
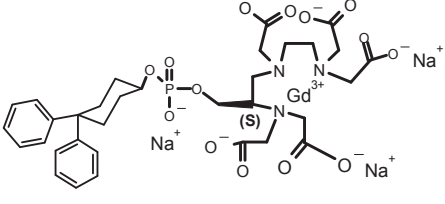
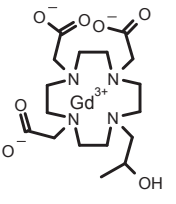
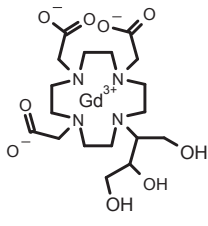
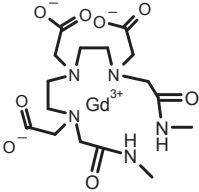
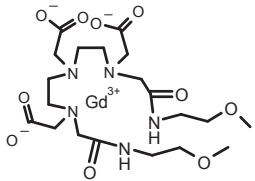
	Complexes macrocycliques	Complexes linéaires	
Ioniques	 <p>Gd-DOTA, acide gadotérique, Dotarem®</p>	 <p>Gd-DTPA, acide gadopentétique, Magnevist®</p>	 <p>Gd-BOPTA, acide gadobénique, MultiHance®</p>
	 <p>Gd-EOB-DTPA, acide gadoxétique, Primovist/Eovist®</p>	 <p>MS325, gadofosveset, Vasovist/Ablavar®</p>	
Non-ioniques	 <p>Gd-HP-DO3A, gadotéridol, ProHance®</p>	 <p>Gd-BT-DO3A, gadobutrol, Gadovist/Gadavist®</p>	 <p>Gd-DTPA-BMA, gadodiamide, Omniscan®</p>
			 <p>Gd-DTPA-BMEA, gadoversétamide, OptiMARK®</p>

Figure 43 : Structure moléculaire des complexes de gadolinium commercialisés à ce jour (d'après Port et coll. 2008)

L'acide gadotérique, l'acide gadopentétique, le gadobutrol, le gadodiamide, le gadoversétamide et le gadotéridol sont des agents dits « **non spécifiques** », ils ne présentent, en effet, aucune spécificité tissulaire. Ce sont des marqueurs exclusifs de **l'espace extracellulaire**. Ils sont généralement administrés à la dose de **0,1 mmol/kg** de poids corporel mais la dose totale peut être augmentée jusqu'à 0,3 mmol/kg pour certaines indications. La solution pharmaceutique de ces CGs est concentrée en gadolinium à 0,5 M (500 mmol/L) sauf le gadobutrol, qui a une concentration de 1 M.

L'acide gadobénique, l'acide gadoxétique et le gadofosveset sont des agents dits « **spécifiques** ». La structure des ligands de ces trois complexes comprend un ou plusieurs cycles aromatiques lipophiles. Les 2 premiers CGs sont utilisés pour l'imagerie du foie car ils sont spécifiquement **captés par les hépatocytes** et permettent la détection des lésions

hépatiques. Le gadofosveset, quant à lui, est indiqué pour l'angiographie car il se lie à l'albumine plasmatique, ce qui lui confère une **rémanence vasculaire**.

Certains complexes de gadolinium sont formulés avec **un excès de ligand** dans leur solution pharmaceutique (**Tableau 7**). C'est notamment le cas du gadodiamide et, dans une moindre mesure, de l'acide gadopentétique. L'ajout de ligand permet ainsi de bloquer l'éventuelle libération de Gd^{3+} dans leur flacon avant leur administration au patient. Dans le cas du gadobutrol, un léger excès du ligand calcium est ajouté afin de piéger les impuretés métalliques qui peuvent apparaître pendant le processus de stérilisation. Enfin, l'acide gadotérique et l'acide gadobénique ne sont pas formulés.

Tableau 7 : Formulation de la solution pharmaceutique des 5 CGs (d'après Idée et coll., 2006)

Produit	Nom de marque	Excipient	Quantité
acide gadotérique	Dotarem [®]	-	-
gadobutrol	Gadovist/Gadavist [®]	Ca-BT-DO3A	1 mmol/L
gadotéridol	ProHance [®]	[Ca-HP-DO3A] ₂	0,5 mmol/L
acide gadobénique	MultiHance [®]	-	-
acide gadoxétique	Primovist/Eovist [®]	Ca-EOB-DTPA	1,5 mmol/L
gadofosveset	Vasovist/Ablavar [®]	Ligand fosveset	0,325 mmol/L
acide gadopentétique	Magnevist [®]	DTPA	1 mmol/L
gadodiamide	Omniscan [®]	Ca-DTPA-BMA	25 mmol/L
gadoversétamide	OptiMARK [®]		50 mmol/L

Le premier agent de contraste à base de gadolinium commercialisé fut l'acide gadopentétique (Magnevist[®]) en 1986, suivi rapidement de l'acide gadotérique (Dotarem[®]) en 1989, premier macrocycle, puis du gadotéridol (ProHance[®]) en 1992 et du gadodiamide (Omniscan[®]) en 1993 (Runge et coll., 2011). La première indication clinique de ces agents a concerné les pathologies du système nerveux central, et plus particulièrement, la mise en évidence de la rupture de la barrière hématoencéphalique (BHE) par IRM. Aujourd'hui, les CGs ont d'autres indications telles que l'imagerie du foie, du sein ou des vaisseaux. Les CGs ne sont pas disponibles dans tous les pays et ont des indications qui diffèrent selon les pays (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Disponibilité des CGs en fonction des pays (d'après Runge et coll. 2011)

Principe actif	DCI	Nom de marque	Compagnie	1 ^{ère} autorisation	Indications*	Pays
acide gadotérique	gadotérate de méglumine	Dotarem [®]	Guerbet	1989 Europe	SNC, angiographie, corps entier	Europe, Australie, Asie, Etats-Unis (depuis 2013)
gadobutrol	gadobutrol	Gadovist/Gadavist [®]	Bayer	1998 Europe	SNC, angiographie, foie, rein	Etats-Unis (depuis 2011), Canada, Europe, Australie, Japon
gadotéridol	gadotéridol	ProHance [®]	Bracco	1992 Etats-Unis	SNC, corps entier	Etats-Unis, Europe
acide gadobénique	gadobénate de diméglumine	MultiHance [®]	Bracco	1997 Europe	SNC, foie, corps entier	Etats-Unis, Canada, Europe, Australie, Japon
acide gadoxétique	gadoxétate disodique	Primovist/Eovist [®]	Bayer	2004 Europe	Foie	Etats-Unis, Europe
gadofosveset	gadofosveset trisodique	Vasovist/Ablavar [®]	Lantheus	2005 Europe	Angiographie périphérique	Etats-Unis, Europe
acide gadopentétique	gadopentétate de diméglumine	Magnevist [®]	Bayer	1986 Europe	SNC, corps entier	Etats-Unis, Canada, Europe, Canada, Asie
gadodiamide	gadodiamide	Omniscan [®]	General Electric	1993 Etats-Unis	SNC, corps entier	Etats-Unis, Canada, Europe, Australie
gadoversétamide	gadoversétamide	OptiMARK [®]	Covidien	1999 Etats-Unis	SNC, foie	Etats-Unis

2.7 Propriétés physicochimiques des complexes de gadolinium

2.7.1 Osmolalité

Tous les complexes de gadolinium commercialisés à ce jour sont **hyperosmolaires**. L'osmolalité des liquides extracellulaires est comprise entre 280 et 300 mOsm/Kg H₂O alors que l'osmolalité des CGs varie entre 630 et 1960 mOsm/Kg H₂O (**Tableau 9**). L'osmolalité dépend du nombre de particules présentes dans la solution. Par conséquent, les complexes ioniques ont une osmolalité supérieure par rapport aux molécules non ioniques. Néanmoins, l'augmentation de l'osmolalité du plasma suite à l'injection d'un CG à la dose clinique de 0,1 mmol/kg est négligeable, n'a pas d'impact sur la balance osmotique et donc n'a aucun effet hémodynamique chez le patient. En effet, **la charge osmotique des CGs est faible** (elle est comprise entre 0,7 et 2 mOsm/L) (**Tableau 9**) et nettement inférieure à celle d'un PCI, environ 10 mOsm/L pour un PCI non ionique tri-iodé à la posologie utilisée pour un examen tomodensitométrie (Thomsen, 2005).

Tableau 9 : Osmolalité et charge osmotique des différents CGs (d'après Port et coll., 2008)

Produit	Structure	Concentration (mmol/L)	Osmolalité à 37°C (mOsm/kg H ₂ O)	Charge osmotique* (mOsm/L)
acide gadotérique	Macrocyclique Ionique	500	1350	1,3
gadobutrol	Macrocyclique Non ionique	1000	1603	0,7
gadotéridol	Macrocyclique Non ionique	500	630	0,7
acide gadobénique	Linéaire Ionique	500	1970	2,0
acide gadoxétique	Linéaire Ionique	250	688	0,5
gadofosveset	Linéaire Ionique	250	825	0,8
acide gadopentétique	Linéaire Ionique	500	1960	2,0
gadodiamide	Linéaire Non ionique	500	789	0,7
gadoversétamide	Linéaire Non ionique	500	1110	0,7

$$* \text{ Charge osmotique} = \frac{\text{dose} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{kg}} \right) \times 70}{V_{\text{distribution}} (L)} \times \text{nombre d'ions dissociés}$$

2.7.2 Viscosité

La viscosité des différentes solutions pharmaceutiques est présentée dans le **Tableau 10** ci-dessous. La **viscosité** des CGs dépend de leur **concentration en gadolinium**. Le gadobutrol étant deux fois plus concentré que les autres CGs, il a une viscosité supérieure. Le **cycle aromatique** de l'acide gadobénique induit également une augmentation de sa viscosité.

Tableau 10 : Viscosité des solutions pharmaceutiques des CGs (d'après Port et coll., 2008)

Produit	Structure	Concentration (mmol/L)	Viscosité à 37°C (mPa.s)
acide gadotérique	Macrocyclique Ionique	500	2,0
gadobutrol	Macrocyclique Non ionique	1000	5,0
gadotéridol	Macrocyclique Non ionique	500	1,3
acide gadobénique	Linéaire Ionique	500	5,3
acide gadoxétique	Linéaire Ionique	250	1,19
gadofosveset	Linéaire Ionique	250	2,1
acide gadopentétique	Linéaire Ionique	500	2,9
gadodiamide	Linéaire Non ionique	500	1,4
gadoversétamide	Linéaire Non ionique	500	2,0

2.7.3 Relaxivité

L'**efficacité** des CGs dépend de leur **relaxivité**. Ils sont donc caractérisés par des **constantes de relaxivité longitudinale r_1 et transversale r_2** (toutes deux exprimées en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (**Tableau 11**), qui définissent la vitesse avec laquelle le CG va accélérer le retour à l'équilibre de l'aimantation. La relaxivité correspond à la contribution que le CG apporte, à la concentration de 1 mM, à la vitesse de relaxation (en s^{-1}) des protons présents dans les tissus.

La relaxivité est donc la mesure de la vitesse de relaxation paramagnétique longitudinale R_1 ou transversale R_2 des protons à un champ magnétique et à une température donnée, et à différentes concentrations en agent de contraste paramagnétique. Elle représente ainsi la pente de la droite $R_1 = f([\text{Gd}])$ (**Figure 44**).

La **vitesse de relaxation** est définie par l'inverse du temps de relaxation :

$$\text{Équation 1 : } R_{1,2} (s^{-1}) = \frac{1}{T_{1,2}}.$$

La **constante de relaxivité** est définie par :

$$\text{Équation 2 : } r_{1,2} (mM^{-1}.s^{-1}) = \frac{R_{1,2}}{[Gd]} = \frac{1}{T_{1,2} \times [Gd]}.$$

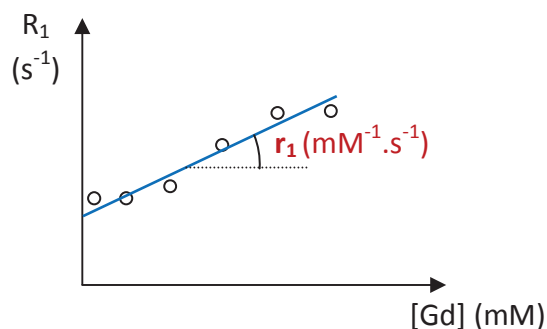


Figure 44 : Constante de relaxivité r_1 définie par la vitesse de relaxation (R_1) normalisée par sa concentration en Gd ($[Gd]$).

Les CGs non spécifiques possèdent des constantes de relaxivité r_1 et r_2 **équivalentes** (**Tableau 11**) et ces dernières sont similaires pour un champ magnétique compris entre 0,47 et 4,7 Tesla. Dans le **plasma**, les constantes de relaxivité sont **plus élevées** du fait de l'augmentation de la viscosité (**Tableau 12**). Les CGs spécifiques dont **l'acide gadobénique**, ont une relaxivité **légèrement supérieure** à celles des produits non spécifiques, mais essentiellement dans un milieu contenant des protéines (comme dans le plasma), auxquelles ils se lient (**Tableau 12**). En effet, la **liaison protéique** qui conduit à la formation d'un adduit macromoléculaire, augmente leur taille moléculaire et leur temps de corrélation rotationnelle. Néanmoins, la relaxivité des CGs qui se lient aux protéines est dépendante de la concentration de l'agent et de celle des protéines (Port et coll., 2008).

Tableau 11 : Constantes de relaxivité r_1 et r_2 des CGs dans l'eau, à 37°C et à 1,5 Tesla (d'après Port et coll., 2008)

Produit	r_1 ($mM^{-1}.s^{-1}$)	r_2 ($mM^{-1}.s^{-1}$)
acide gadotérique	3,0	3,5
gadobutrol	3,3	3,9
gadotéridol	2,9	3,4
acide gadobénique	3,8	4,4
acide gadoxétique	4,6	5,3
gadofosveset	5,0	5,9
acide gadopentétique	3,3	3,9
gadodiamide	3,3	3,9
gadoversétamide	3,6	4,1

Tableau 12 : Constantes de relaxivité r_1 et r_2 des CGs dans le plasma bovin, à 37°C et à 1,5 Tesla
(d'après Rohrer et coll., 2005)

Produit	r_1 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)
acide gadotérique	3,6	4,3
gadobutrol	5,2	6,1
gadotéridol	4,1	5,0
acide gadobénique	6,3	8,7
acide gadoxétique	6,9	8,7
gadofosveset	19	34
acide gadopentétique	4,1	4,6
gadodiamide	4,3	5,2
gadoversétamide	4,7	5,2

Le Gd raccourcissant majoritairement le T_1 aux doses cliniques, nous nous sommes intéressés, dans nos travaux, uniquement à la **constante de relaxivité r_1** .

2.8 Stabilités

Le gadolinium (Gd^{3+}) libre étant très toxique, il est très important que les complexes de gadolinium soient **très stables** afin de ne pas libérer de Gd^{3+} . La stabilité d'un complexe peut être décrite selon deux concepts : la **stabilité thermodynamique** et la **stabilité cinétique**.

2.8.1 Stabilité thermodynamique

Comme nous l'avons vu précédemment, à cause de sa toxicité intrinsèque, l'ion Gd^{3+} doit être impérativement complexé par un ligand approprié pour pouvoir être administré. Par définition, le gadolinium étant complexé, un équilibre thermodynamique existe entre le métal (Gd), le ligand (L) et le complexe (GdL) :



La **stabilité thermodynamique** du complexe est exprimée par la constante K_{therm} qui est définie par :

$$\text{Équation 4 : } K_{therm} = \frac{[GdL]}{[Gd] \times [L]}$$

La stabilité thermodynamique peut aussi être caractérisée par la constante de stabilité thermodynamique apparente à **pH physiologique**, la **constante de stabilité conditionnelle** K_{cond} , qui intègre les constantes de protonation du ligand. La constante K_{cond} reflète la compétition entre le Gd^{3+} et les protons pour le ligand. Elle est définie par la concentration totale de ligand libre $[L_T]$ au lieu de la concentration du ligand libre $[L]$ (Équation 5). Cette constante K_{cond} est, logiquement, plus pertinente au plan physiologique.

Équation 5 :
$$K_{cond} = \frac{[GdL]}{[Gd] \times [L_T]}$$
 où L_T est la concentration totale du ligand non complexé, soit $\{[L_T] = [L] + [HL] + [H_2L] + \dots + [H_nL]\}$.

Elle peut également être exprimée en fonction de K_{therm} :

$$\text{Équation 6 : } K_{cond} = \frac{K_{therm} \times L}{L_T}$$

Le **Tableau 13** ci-dessous présente les valeurs des constantes $\text{Log } K_{therm}$ et $\text{Log } K_{cond}$.

Tableau 13 : Constantes de stabilités thermodynamique ($\text{Log } K_{therm}$) et conditionnelle ($\text{Log } K_{cond}$) (d'après Port et coll., 2008)

Produit	$\text{Log } K_{therm}$ (pH 11,0)	$\text{Log } K_{cond}$ (pH 7,4)
acide gadotérique	25,6	19,3
gadobutrol	21,8	14,7
gadotéridol	23,8	17,1
acide gadobénique	22,6	18,4
acide gadoxétique	23,46	18,7
gadofosveset	22,1	18,9
acide gadopentétique	22,1	17,7
gadodiamide	16,9	14,9
gadoversétamide	16,6	15,0

Les CGs ioniques ont un $\text{Log } K_{cond}$ généralement supérieur à celui des CGs non ioniques (**Figure 45**). Par conséquent, les CGs ioniques sont thermodynamiquement plus stables que les complexes non ioniques.

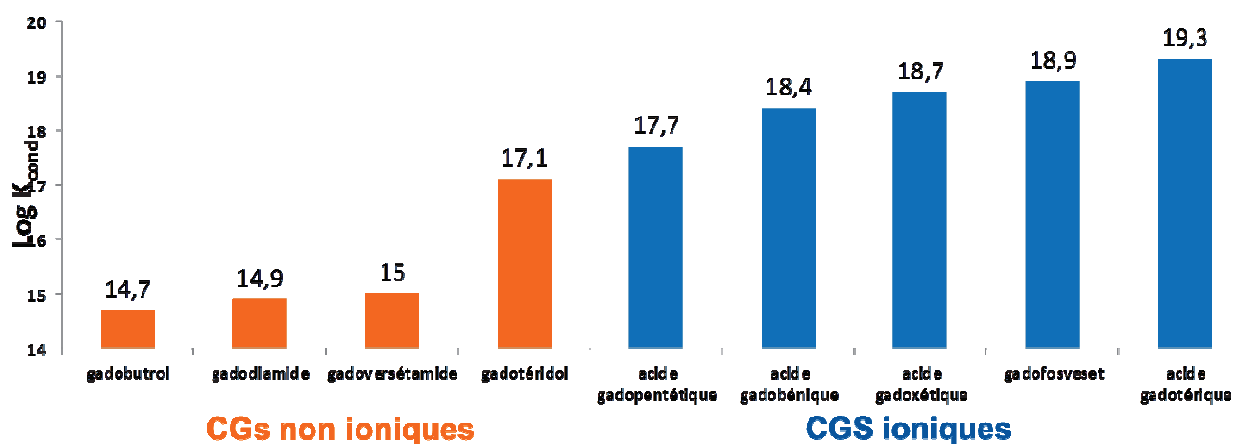


Figure 45 : Représentation graphique du $\text{Log } K_{cond}$ (pH physiologique)

Les liaisons chimiques entre le ligand et le Gd^{3+} sont majoritairement électrostatiques et les CGs stables sont formés à partir de ligands polyazacarboxyliques. Trois éléments essentiels influencent la stabilité thermodynamique des CGs (Port et coll., 2008) :

- L'acidité de la structure polyazacarboxylique car le pKa est directement lié aux interactions électrostatiques entre l'atome Gd^{3+} et certains atomes donneurs du ligand.
- La présence de cycles (N-Gd-N et N-Gd-O).
- L'effet macrocyclique associé à la taille de la cavité formée par le ligand et à sa rigidité moléculaire.

2.8.2 Stabilité cinétique

La **stabilité cinétique** est l'autre caractéristique essentielle de ces complexes. La stabilité cinétique d'un complexe exprime la vitesse de dissociation de ce complexe, effective tant que l'équilibre thermodynamique n'est pas atteint. En fait, elle correspond à la durée nécessaire au complexe métallique pour atteindre l'état d'équilibre (décrit par l'**Équation 3**). Elle peut être évaluée expérimentalement par la **demi-vie du complexe** en milieu acide. Cette demi-vie ($T_{1/2}$) des CGs linéaires est nettement plus faible (inférieur à 5 secondes) que celle des CGs macrocycliques (**Tableau 14 ; Figure 46**).

Parmi les CGs macrocycliques, la stabilité cinétique la plus élevée est celle de l'acide gadotérique. Ce phénomène s'explique par la structure macrocyclique très symétrique et la présence de quatre fonctions acides carboxyliques engagées dans des liaisons électrostatiques fortes avec le métal.

Tableau 14 : Demi-vie de dissociation de tous les complexes de gadolinium, étudiés dans des conditions strictement identiques, à pH 1,0 et à 25°C (d'après Port et coll., 2008)

Produit	Demi-vie $T_{1/2}$, à pH 1,0 et à 25°C
Acide gadotérique	338 heures
gadobutrol	43 heures
gadotéridol	3,9 heures
acide gadobénique	< 5 secondes
acide gadoxétique	< 5 secondes
gadofosveset	< 5 secondes
acide gadopentétique	< 5 secondes
gadodiamide	< 5 secondes
gadoversétamide	< 5 secondes

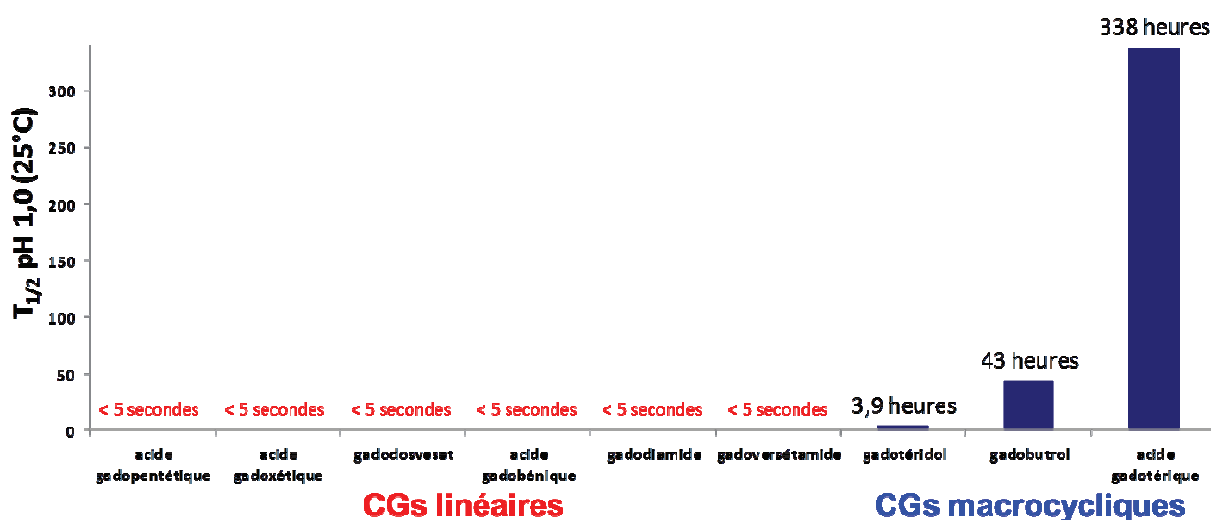


Figure 46 : Représentation graphique de la demi-vie des complexes ($T_{1/2}$, pH 1,0, 25°C)

La stabilité des CGs a également été évaluée à **pH physiologique et à 37°C dans du sérum humain**, sur une période de 15 jours (Frenzel et coll., 2008). Les **CGs linéaires se dissocient** dans du sérum humain, plus rapidement et dans une proportion plus importante dans le cas des CGs linéaires non ioniques (le phénomène survenant après quelques heures) que les ioniques (quelques jours). Au contraire, **aucune dissociation n'a été observée** dans le cas des **CGs macrocycliques** (voir notamment la section 3.10 Hypothèses mécanistiques du Chapitre 3).

2.8.3 Relation structure/stabilité

Les stabilités thermodynamique et cinétique décrivent un même phénomène et doivent être interprétées **conjointement**. Ceci peut être illustré par un tonneau percé. La **Figure 47** montre la libération de Gd^{3+} libre à partir de CG, avec différentes stabilités thermodynamiques et cinétiques. Le tonneau représente le complexe de gadolinium et le liquide contenu à l'intérieur, le Gd^{3+} « libre ». La hauteur du trou dans la paroi du tonneau représente la stabilité thermodynamique alors que de son diamètre dépend la stabilité cinétique du CG. Le meilleur scénario est le cas « A », pour lequel une faible quantité de Gd^{3+} sera libérée (**stabilité thermodynamique élevée**) et très lentement (**stabilité cinétique élevée**), ce qui correspond à un **CG à la fois macrocyclique et ionique**. A l'inverse, le scénario le plus défavorable correspondrait au cas « D », où une quantité importante de Gd^{3+} pourrait être libéré (**faible stabilité thermodynamique**) et très rapidement (**faible stabilité cinétique**) (CG à la fois linéaire et non ionique).

Si l'on attend suffisamment longtemps pour que l'équilibre entre le Gd^{3+} libre et la forme complexée soit atteint, la quantité de Gd^{3+} libérée dépend uniquement de la stabilité thermodynamique. Cependant, dans des conditions physiologiques, il est probable que l'état

d'équilibre ne soit jamais atteint. Par conséquent, la quantité de Gd^{3+} libérée dépend, à la fois, des stabilités thermodynamique et cinétique.

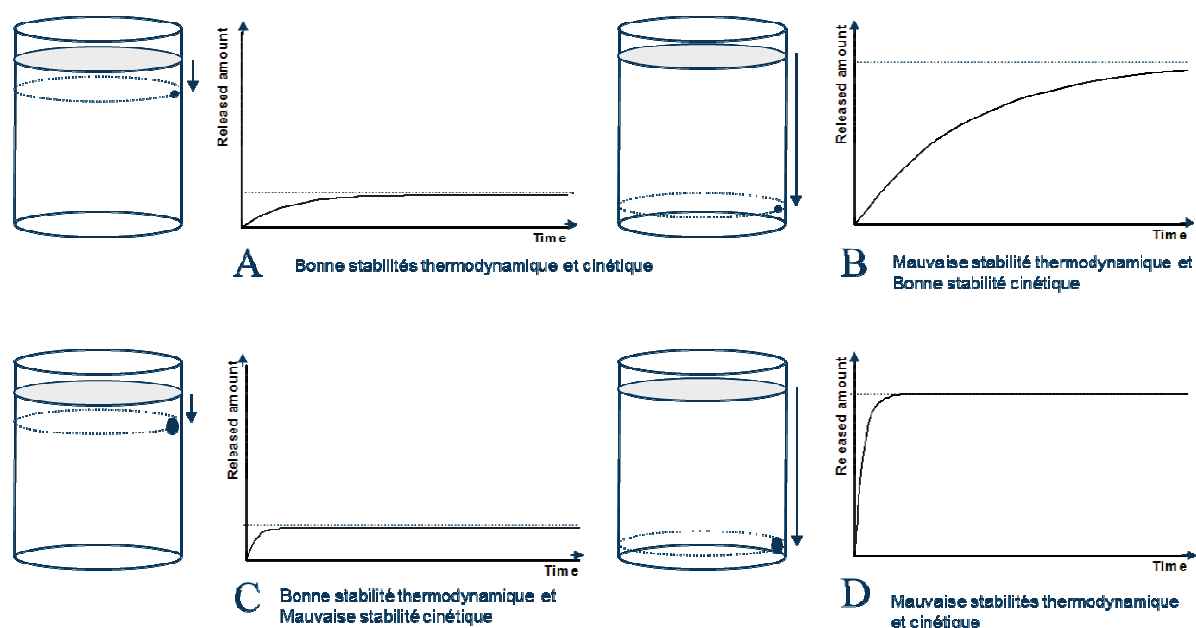
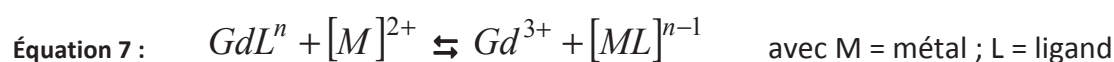


Figure 47 : Modélisation de la concentration de gadolinium libre libéré par les CGs de différentes stabilités thermodynamique et cinétique (Idée et coll., 2009)

2.8.4 Transmétallation

Différentes réactions de compétition peuvent avoir lieu dans un milieu physiologique, notamment des échanges métal-métal appelés « **transmétallation** ». L'ion Gd^{3+} libéré peut alors être complexé par des protéines, des ligands endogènes ou combiné à des anions précipitants (CO_3^{2-} , OH^- , PO_4^{3-} , insolubles au-dessus de pH 6,2) alors que le ligand libre peut réagir avec des ions endogènes tels que Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} et Zn^{2+} . Il y a donc un **échange** entre le Gd^{3+} et des **ions endogènes**, induisant la **dissociation du complexe**.

Ce phénomène de transmétallation correspond à l'équation suivante :



Cette possibilité d'échange dépend de l'affinité entre l'ion endogène et le ligand du CG (**Tableau 15**) mais aussi de sa concentration présente dans le milieu biologique. Par exemple, le Fe^{3+} libre (la majorité étant liée à la transferrine ou l'hémoglobine) et le Cu^{2+} sont présents en faible quantité dans le sang et le Ca^{2+} présente une affinité pour les ligands des CGs plus faible que celle de ces métaux (**Tableau 15**) (Hao et coll., 2012). Le zinc présente, quant à lui, une bonne affinité pour les ligands et peut être présent en forte concentration dans certains milieux biologiques tels que les os ou le foie (McBean et coll., 1972). Il pourrait ainsi s'échanger avec le gadolinium. Deux équipes ont montré que le **zinc accélère la dissociation**

des CGs linéaires en présence d'une concentration élevée de phosphate, par relaxométrie (Laurent et coll., 2010 ; Robic et coll., 2011). Laurent et coll. (2010) ont décrit une méthode d'évaluation de la transmétallation par relaxométrie. Leur méthode est basée sur le postulat suivant : dans un tampon phosphate, lorsque le Zn^{2+} s'échange avec le Gd^{3+} , le Gd dissocié du CG peut ainsi réagir avec ions PO_4^{3-} et former du $GdPO_4$. Ce sel est très peu soluble, il n'interfère donc quasiment pas avec le temps de relaxation. Par conséquent, un raccourcissement de la vitesse de relaxation (R_1) est donc observé.

Tableau 15 : Stabilité thermodynamique (Log K_{therm} ou Log K_{cond}) de différents complexes métalliques (d'après Port et coll., 2008)

Ligand	Log K_{therm}	Log K_{therm}	Log K_{therm}	Log K_{cond}	Log K_{cond}	Log K_{cond}
	CaL	CuL	ZnL	CuL	ZnL	FeL
DOTA	17,23	22,63	21,05	15,7	13,8	22,7
HP-DO3A	14,83	22,84	19,37	N/D	N/D	N/D
BOPTA	N/D	N/D	N/D	17,3	13,9	23,4
DTPA	10,75	21,38	18,29	16,8	13,8	23,4
DTPA-BMA	7,17	13,03	12,04	11,1	10,1	N/D

2.9 Pharmacocinétique et distribution

Les CGs sont administrés par voie intraveineuse. Ils ne sont **pas métabolisés**.

Les **agents non spécifiques** sont rapidement distribués dans le **compartiment extracellulaire** après injection. Le volume apparent de distribution varie entre 210 et 280 mL/kg selon les études, ce qui est cohérent avec une distribution exclusivement extracellulaire (Aime et Caravan, 2009). Les CGs sont excrétés **presque exclusivement par voie rénale**. Leur demi-vie d'élimination est de l'ordre de **1,5 heure** chez le volontaire sain. Elle est, logiquement augmentée en cas d'insuffisance rénale (Chachuat et coll., 1992). Par exemple, la demi-vie d'élimination du gadodiamide passe de 1,5 heure chez le volontaire sain à plus de 30 heures chez l'insuffisant rénal chronique de stade 5 (Joffé et Thomsen, 1998).

L'**acide gadobénique** est **capté par les hépatocytes** (Pascolo et coll., 1999) et peut ainsi être éliminés par le **système hépatobiliaire**. Chez l'Homme, **0,6 à 4%** sont éliminés de cette manière, le restant étant excrété par voie rénale (Spinazzi et coll., 1999). Son volume de distribution est également consistant avec une distribution dans le **compartiment extracellulaire**. Sa demi-vie d'élimination est de l'ordre de **1,5 heure** (Spinazzi et coll., 1999). Contrairement aux CGs non spécifiques, l'acide gadobénique **peut se lier aux protéines** ou **aux macromolécules**, ce qui augmente sa relaxivité (Cavagna et coll., 1997).

Chez l'Animal comme chez l'Homme, la pharmacocinétique des CGs non spécifiques est décrite par un modèle **bi-compartimental**, avec une rapide distribution dans le compartiment extracellulaire. Chez l'Animal, les CGs **ne sont pas métabolisés** et sont

éliminés par voie rénale. Néanmoins, leur **demi-vie est plus courte** que celle observée chez l'Homme (environ 20 minutes chez le Rat) (Oksendal et Hals, 1993). En revanche, chez le Rat, l'excrétion biliaire de l'**acide gadobénique** est plus élevée que chez l'Homme (**50%**, 7 heures après injection chez le Rat contre environ 4% chez l'Homme) (Lorusso et coll., 1999).

La pharmacocinétique et la biodistribution du **Gd « libre »** soluble (acétate de Gd ou chlorure de Gd) est **nettement différente** de celle des CGs (Bussi et coll., 2007 ; Dean et coll., 1988 ; Grant et coll., 2009 ; Wedeking et coll., 1993). Après administration chez le Rat ou la Souris, le Gd « libre » est rapidement distribué dans le **foie**. Il s'accumule également dans les **os**. Sa distribution tissulaire est **dépendante de la dose** et du **temps**. Après administration d'une faible dose (0,1 à 10 $\mu\text{mol/kg}$), la quantité de Gd dans le foie est très diminuée par rapport à une forte dose (100 ou 250 $\mu\text{mol/kg}$), probablement dû à la formation de colloïdes de phosphates ou hydroxydes de Gd, qui sont rapidement phagocytés par le système réticulo-endothélial de cet organe (Oksendal et Hals, 1993 ; Wedeking et coll., 1993). De plus, la **distribution** dans le **fémur** est **inversement dépendante de la dose** (Wedeking et coll., 1993), probablement à cause d'un effet de saturation.

2.10 Tolérance

Comme nous l'avons vu précédemment, le **Gd³⁺ libre** est **très toxique**, il peut bloquer le système réticuloendothélial et entrer en compétition avec le calcium dans l'organisme. Sa **toxicité aiguë (GdCl₃)** est de **0,38 mmol/kg** après injection IV (dose létale 50% ou DL₅₀) chez le Rat, alors qu'après complexation avec un ligand approprié, sa toxicité est fortement réduite. Par exemple, la DL₅₀ d'un CG macrocyclique, l'acide gadotérique, est **supérieure à 12,6 mmol/kg** (Bousquet et coll., 1988) et celle d'un CG linéaire et ionique, l'acide gadopentétique, est de 8 mmol/kg chez le Rat (Gries, 2002). Le **ligand « libre »** est lui aussi, **toxique**. Ainsi, la DL₅₀ du ligand de l'acide gadopentétique (DTPA) est de **0,5 mmol/kg** chez le Rat (Gries, 2002). Par conséquent, le CG est, dans ce cas, 20 fois moins toxique que le Gd ou le ligand « libres ».

Au plan clinique, la **tolérance des CGs** était généralement considérée comme **excellente** (Caravan, 1999) avant la mise en évidence d'un lien causal avec la FSN. Ils n'induisent pas de toxicité cardiaque et notamment une prolongation de l'espace QT sur l'électrocardiogramme (Bourrinet et coll., 2007), de modification des marqueurs biologiques classiques (Chachuat et coll., 1992). Leur toxicité rénale est faible aux doses cliniques (Deray et coll., 1990, Ledneva 2010). Ils peuvent toutefois induire des réactions d'hypersensibilité, parfois très sévères, mais qui restent, cependant, rares (Galera et coll. 2010 ; Laroche et coll., 2010).

Un lien causal entre l'administration d'un CG et le **développement de la FSN** chez des patients insuffisants rénaux a été récemment mis en évidence (Grobner, 2006). Cette découverte a amené les autorités de santé à établir des **recommandations d'utilisation** des CGs chez les patients « à risque » et à la contre-indication de certains agents chez les

patients insuffisants rénaux (voir notamment le paragraphe 3.8 Recommandations des autorités de santé).

Chapitre 3 : LA FIBROSE SYSTEMIQUE NEPHROGENIQUE

3.1 Introduction – Contexte

La FSN a été initialement diagnostiquée **en 1997** chez 14 patients dialysés présentant un épaissement et une induration importante de la peau. Ces cas ont été décrits en 2000, par un pathologiste américain, Shawn Cowper comme une forme particulière de scléromyxœdème (Cowper et coll., 2000). Malgré les similitudes observées avec le scléromyxœdème, de nombreuses spécificités ont été identifiées comme sa survenue exclusivement chez des patients insuffisants rénaux ou la présence abondante de cellules positives pour le marquage CD34/collagène I. Suite aux manifestations uniquement cutanées observées dans un premier temps, le terme « **dermopathie fibrosante néphrogénique** » a été proposé pour décrire cette nouvelle entité (Cowper et coll., 2001). Sa **nature systémique** a été mise en évidence en 2003 (Cowper 2005 ; Krous et coll., 2007 ; Kucher et coll., 2006 ; Ting et coll., 2003), amenant donc à remplacer son nom par celui de « **fibrose systémique néphrogénique** ».

En **2006**, deux équipes européennes ont, de manière indépendante, suggéré l'existence **d'un lien entre cette maladie observée chez des patients insuffisants rénaux et l'injection au préalable de CGs** utilisés en IRM (Grobner, 2006 ; Marckmann et coll., 2006). A ce jour, plus de 800 cas de FSN chez des patients insuffisants rénaux ont été publiés dans la littérature, dans 28 pays (Pirovano et coll., 2012). L'autorité de santé américaine (Food and Drug Administration, FDA) recense 1600 cas dans sa base de données (Bennet et coll., 2012).

La FSN ne semble pas avoir de prédilection ethnique (Braverman et Cowper, 2010). Elle touche les 2 sexes (ratio 1:1) et l'âge moyen des patients est de 52 ans mais des cas pédiatriques et gériatriques sont également observés (Braverman et Cowper, 2010).

Les symptômes apparaissent généralement entre 2 à 10 semaines (avec une médiane à 5 semaines) après l'exposition à un CG. Cependant, des cas cliniques où les premiers signes sont survenus quelques années après la dernière administration, ont été rapportés (Do et coll., 2012 ; Grebe et coll., 2008 ; Heinz-Peer et coll., 2010).

3.2 Caractéristiques cliniques :

3.2.1 Manifestations cutanées

Les manifestations cutanées sont toujours présentes et généralement inaugurales. Elles se caractérisent par un **épaississement** et une **induration** importante de la peau. Elles débutent le plus souvent, au niveau des extrémités distales des membres inférieurs (toujours atteints), puis s'étendent ensuite à tous les membres inférieurs, aux membres supérieurs et enfin, au tronc. Elles sont généralement bilatérales et symétriques (Cowper et coll., 2008). Le visage et le cou sont toujours épargnés, ce qui permet de différencier la FSN des autres états

sclérodermiformes (Knopp et Cowper, 2008). L'atteinte dermatologique se manifeste par des tuméfactions œdémateuses, avec des **papules** érythémateuses, des **plaques** érythémateuses brunâtres, voire des **nodules** (Cowper et coll., 2008) (**Figure 48**). Secondairement apparaît une sclérose plus ou moins profonde donnant souvent un aspect dit en « **peau d'orange** » (Cowper et coll., 2008) (**Figure 48**). La vitropression fait parfois apparaître une couleur jaunâtre (Senet et coll., 2009). Les lésions sont généralement pigmentées, brunâtres (Cowper et coll., 2008), une hypopigmentation étant plus rare. Le prurit et des sensations de brûlure sont fréquents.

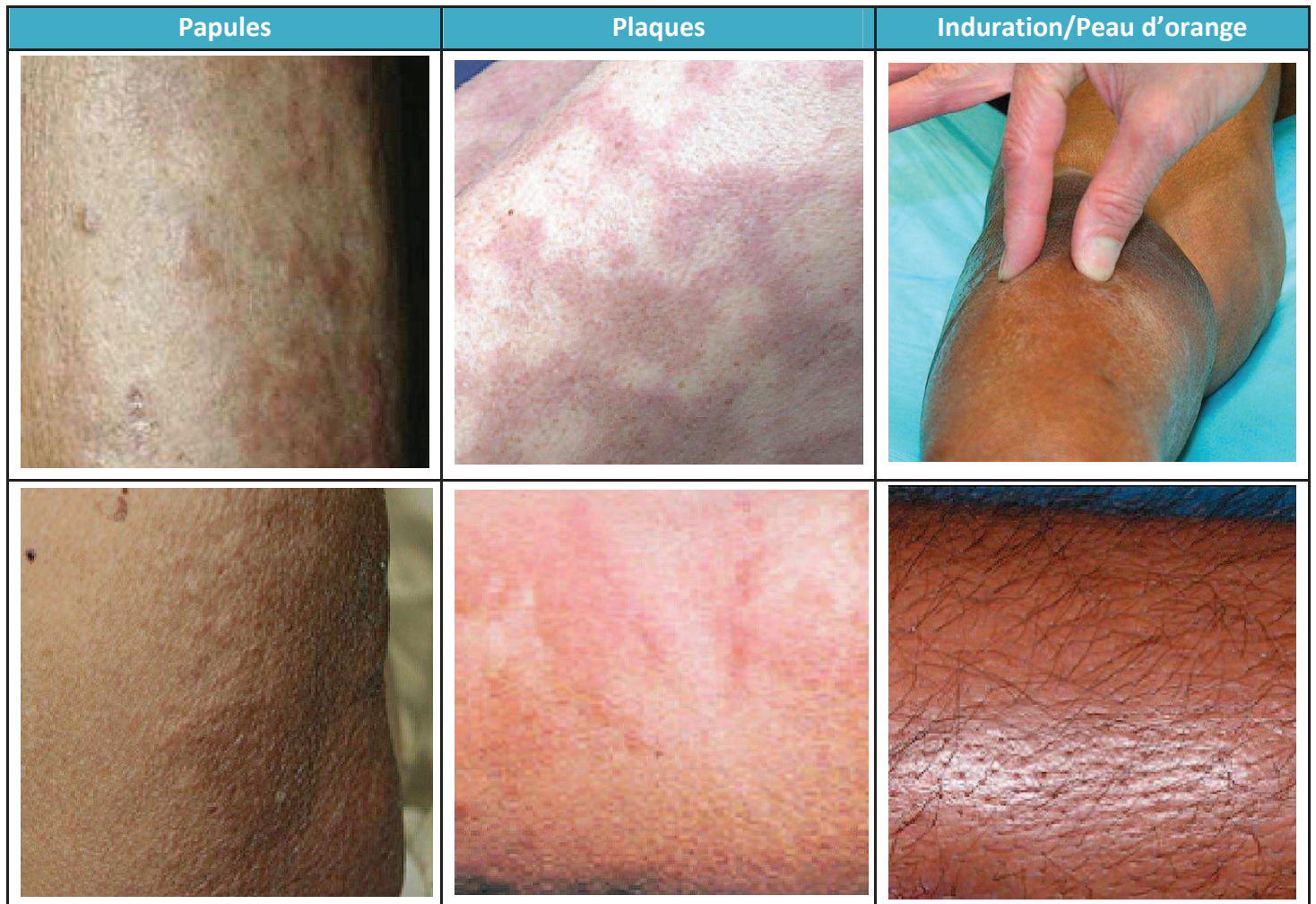


Figure 48 : Aspects cliniques de la FSN (d'après Girardi et coll., 2011)

3.2.2 Manifestations systémiques

Des douleurs sont fréquentes. L'atteinte musculaire et articulaire avec **contractures** (**Figure 49**) parfois sévères, conduisent à une réduction progressive de la mobilité, gênant les actes de la vie quotidienne et dans certains cas, confinant le malade à l'immobilité et au fauteuil roulant.

Des **plaques sclérales** oculaires jaunes, sans modification de la vision, ont été constatées chez certains patients, parfois utiles au diagnostic clinique chez des sujets jeunes, de moins de 45 ans (Basak et Jesmajian, 2011 ; Streams et coll., 2003) (**Figure 49**).

La présence de lésions fibrosantes du myocarde, du péricarde, des valves cardiaques, du parenchyme pulmonaire, de la plèvre, du diaphragme, de l'œsophage, de la dure-mère, des tubules rénaux, a été décrite, généralement dans des séries autopsiques (Galan et coll., 2006 ; Basak et Jesmajian, 2011).



Figure 49 : Aspects systémiques de la FSN (d'après Cowper et coll., 2008 et Girardi et coll., 2011)

3.2.3 Biologie

Il n'existe **aucune anomalie biologique spécifique de la FSN**. Les examens biologiques permettent d'évaluer l'insuffisance rénale (clairance de la créatinine, créatinine plasmatique, métabolisme du fer, métabolisme phosphocalcique) (**Tableau 16**) et d'éliminer d'autres maladies sclérosantes cutanées comme la sclérodémie systémique du fait de l'absence d'anticorps antinucléaires, d'anticorps anti-centromères, d'anti-topoisomérase I ou anti-Scl70 (voir 3.4.1 Sclérodémie) ou le scléromyxoedème du fait de l'absence de gammopathie monoclonale (Boehm, 2009).

Tableau 16 : Analyses biologiques utiles (Knopp et Cowper, 2008)

TABLE 1. Laboratory tests of value in the workup of NSF

Absolute eosinophil count
 Platelet count
 Coagulopathy studies (PT/PTT, protein C and S, antithrombin III, homocysteine, factor V Leiden)
 BUN and creatinine
 Liver panel
 Serum protein electrophoresis and immunoelectrophoresis
 Urine electrophoresis
 Thyroid function tests
 Erythrocyte sedimentation rate
 Antinuclear antibody (IgG subclass)
 Serological autoantibody panels (to include Scl-70, anti-centromere, and anti-RNP)
 Antiphospholipid antibody (anticardiolipin antibody)
 Hepatitis B and C serologies
 Urine porphyrin studies

Reprinted with permission (27)

3.3 Diagnostic

Le diagnostic de la FSN, évoqué sur **la clinique**, doit être conforté par les résultats d'un **examen anatomopathologique** d'une biopsie cutanée. Un système de **scores** clinique et histopathologique (de 0 à 4) de la FSN a été proposé par Girardi et ses collaborateurs (2011). Le croisement des 2 scores permet de poser le diagnostic de la FSN (**Figure 50**). Ces auteurs ont proposé des critères de classification objectifs, cliniques et histopathologiques, majeurs et mineurs (selon leur importance et leur prévalence), afin d'aider au diagnostic de la FSN (**Tableau 17**). Cette classification, développée à l'Université de Yale, est basée sur l'analyse de nombreux cas cliniques, par une équipe de cliniciens et d'histopathologistes possédant une grande expérience de la maladie.

Score histopathologique	Score Clinique				
	0	1	2	3	4
0	Diagnostic alternatif				
1	Pas une FSN				Incompatible
2			Suggérant	Compatible	
3			Compatible	FSN	
4			Incompatible		

Figure 50 : Grille permettant le diagnostic de la FSN (traduit à partir de Girardi et coll., 2011).

Tableau 17 : Critères cliniques et histopathologiques pour la détermination du score (d'après Girardi et coll., 2011).

Critères cliniques majeurs	Plaques structurées Contractures articulaires Induration marquée/ « peau d'orange »
Critères cliniques mineurs	Apparition de plis cutanés Plaque superficielle Papules Plaques sclérales (patient âgé < 45 ans)
Critères histopathologiques	Hypercellularité (score +1) Cellules CD34 positives (score +1) Fibres de collagènes épaissies ou amincies (score +1) Fibres élastiques préservées (score -1 si absent) Implication du septum interlobulaire (score +1) Métaplasie osseuse (score +3)

3.3.1 Critères cliniques

Un examen approfondi de peau du corps entier est essentiel. La présence de **plaques**, d'une **induration** importante, avec ou sans aspect en « peau d'orange », ainsi que la présence de **contractions** articulaires sont des critères majeurs pour le diagnostic de la FSN. En revanche, les plaques ou tâches superficielles, les plaques sclérales et les papules sont considérées comme des critères mineurs.

3.3.2 Critères histopathologiques

Une **biopsie cutanée** est l'examen de référence pour l'établissement du diagnostic de la FSN. La biopsie cutanée doit être bien évidemment prélevée correctement afin de permettre d'observer le derme et l'hypoderme.

La FSN est caractérisée par une **fibrose** du derme. L'épiderme n'est pas altéré. Les lésions histologiques classiquement observées associent un **épaississement du derme**, des **amas de fibres de collagènes** ainsi qu'une inflammation voire une nécrose (Cowper et coll., 2008). Les fibres de collagènes sont **épaissies**, parfois amincies, **désorganisées**, **disposés en tous sens** (score +1 selon le système de score de Girardi et coll., 2011) et les espaces optiquement vides séparant les fibres de collagène sont élargis (

Figure 51). Une **augmentation de la cellularité** du derme (score +1) (Nazarian et coll., 2011) (

Figure 51) ainsi que des dépôts de **mucine** (observé par la coloration au bleu Alcian) sont fréquemment observés. Les **fibres élastiques** sont préservées sans horizontalisation, comme dans la sclérodermie ; si ce critère est absent le score est, par conséquent, de -1 (en cas de présence, le score est 0) (Girardi et coll., 2011) (

Figure 51).

L'étude immuno-histochimique des tissus révèle l'infiltration de **cellules CD34 positives** (score +1) (

Figure 51) (Bucala, 2008).

La présence de myofibroblastes α -SMA positifs chez les patients atteints de FSN est discutée. En effet, la présence de myofibroblastes α -SMA+ a été rapportée dans des lésions de FSN âgées de 3 à 4 semaines (Swartz et coll., 2003 ; Cowper, 2007). Cependant, dans une étude plus récente, le marquage α -SMA était négatif (Kelly et coll., 2010). Une surexpression du marqueur clé de la fibrose, **TGF β** , a été observée dans la peau de patients atteints de FSN (Jiménez et coll., 2004 ; Kelly et coll., 2008 ; Schieren et coll., 2010). Une augmentation de l'expression dermique de **CTGF** a été notée chez les sujets atteints de FSN, en comparaison avec des sujets hémodialysés sans FSN. Cependant, la surexpression de ce marqueur était faible par rapport aux témoins non insuffisants rénaux (Schieren et coll., 2010).

La fibrose peut s'étendre aux tissus sous-cutanés, elle élargit **les septa interlobulaires** (score +1), et induit ainsi une architecture microlobulaire (Cowper et coll., 2008) (

Figure 51).

Des métaplasies osseuses ont été parfois été observées (Wiedemeyer et coll., 2009) (

Figure 51), à l'origine de formation osseuse et dense (ovale ou ronde), composée d'ostéoïde (constitué de collagène), bordé par des ostéoblastes. Les fibres élastiques sont orientées autour de la lésion ostéoïde. Le terme « **lésions en sucette** » a été récemment proposé pour décrire ces corps (suite à leur forme caractéristique) (Grekin et coll., 2012 ; Milles et coll., 2011). Ils sont procollagène I et CD34 négatifs, peu fréquentes mais très spécifiques de la FSN. Aussi, un score de +3 est-il appliqué en leur présence (

Figure 51).

Des foyers de **calcification** peuvent également être notés au niveau du derme (Igreja et coll., 2012).

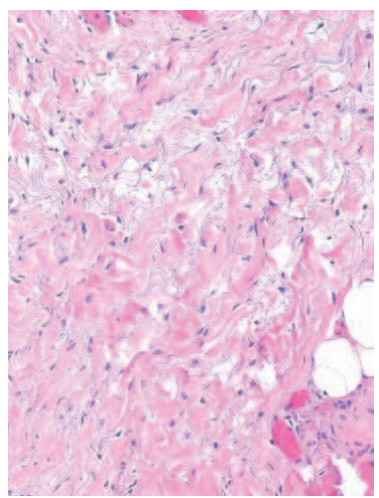
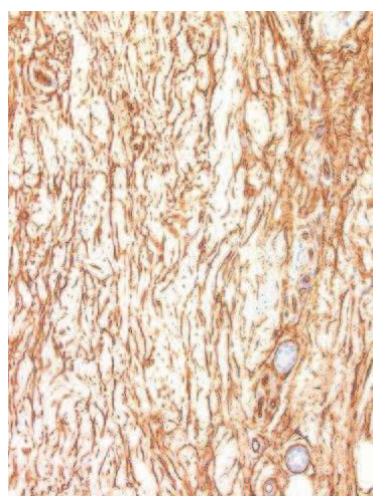
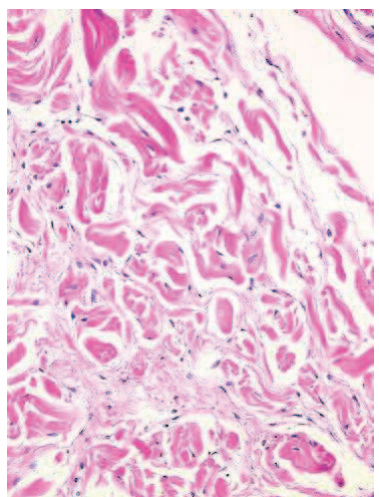
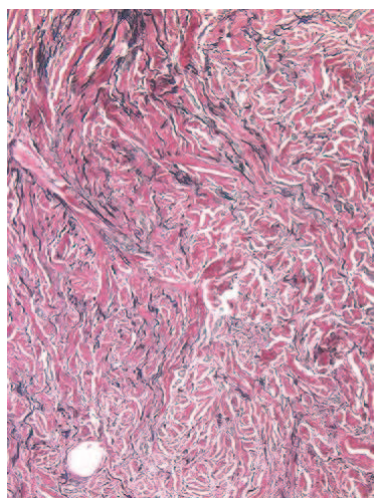
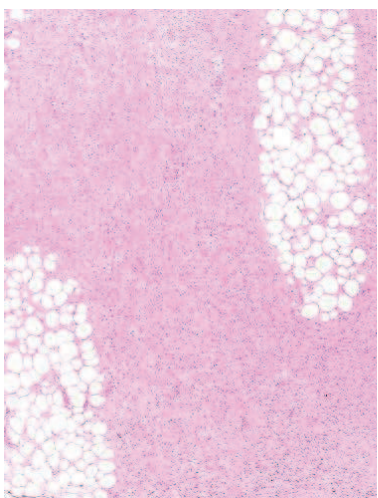
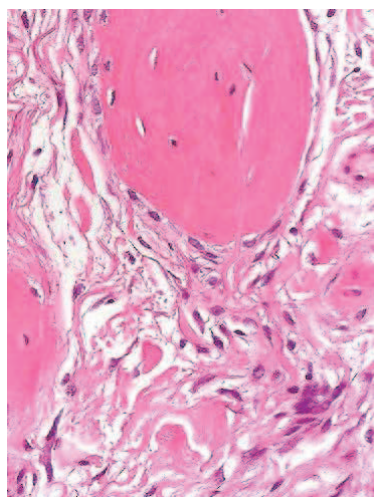
<p>Augmentation de la cellularité</p>		<p>Fibrocytes CD34+</p>		<p>Fibres de collagène épaissies</p>	
<p>Fibres élastiques préservées</p>		<p>Implication du septum interlobulaire</p>		<p>Métaplasie osseuse (signe « de la sucette »)</p>	

Figure 51 : Examen histopathologique de la FSN (d'après Girardi et coll., 2011).

3.3.3 Insuffisance rénale

La présence d'une **insuffisance rénale** est **constante**. A ce jour, aucun cas incontestable n'a été décrit chez un patient non insuffisant rénal.

Chez tous les patients, l'historique de la maladie rénale doit être soigneusement documenté, incluant la cause (si elle est connue) et la progression de l'insuffisance rénale au cours du temps avec un suivi du DFG (« Débit de Filtration Glomérulaire »), de la clairance de la créatinine estimée, ou de variations importantes de la concentration sérique de créatinine au cours d'une courte période. Dans le cas d'une insuffisance rénale aiguë, un suivi des périodes d'oligurie ou d'anurie devra être effectué. Enfin, il est aussi important de renseigner un éventuel traitement par dialyse (avec dates et mode de dialyse) et si le patient a subi une transplantation rénale (avec succès ou non).

3.3.4 Exposition à un ou des CGs

Dans le modèle de Girardi et coll. (2011), la **présence et la quantification des dépôts de Gd n'est pas nécessaire** au diagnostic. En effet, la documentation à l'exposition à un CG est souvent incomplète ou erronée. Il a été, de plus, possible de décrire la maladie comme une nouvelle entité avant que le lien avec l'administration d'un CG soit avéré. Il est cependant essentiel **de renseigner le ou les exposition(s) à un CG** si elles sont connues (**Tableau 18**).

Tableau 18 : Documentation de l'exposition au gadolinium (Girardi et coll., 2011).

Date of exposure:
Agent used:
Indication:
Dose administered (in millimoles):
Last known estimated glomerular filtration rate before exposure (if not on dialysis):
Mode of dialysis (if applicable):
Elapsed time between exposure and first dialysis procedure:
Total lifetime gadolinium exposure:
Did patient have acute renal failure, hepatorenal syndrome, or recent transplant?
Did patient experience unusual or atypical reaction?
Name and location of hospital/radiology center/other:
Please notify:
1. US Food and Drug Administration (https://www.accessdata.fda.gov/scripts/medwatch/medwatch-online.htm)
2. Appropriate contrast manufacturer
3. International NSF Registry (http://www.icnsfr.org)

3.4 Diagnostics différentiels

Le **diagnostic différentiel** de la FSN inclut d'autres pathologies impliquant la présence de lésions cutanées et/ou d'une fibrose cutanée. Il s'effectue à partir des évaluations cliniques

et histopathologiques, décrites dans les paragraphes « Critères cliniques » et « Critères histopathologiques ». Le système de score de Girardi et coll. (2011) est donc un support essentiel au clinicien pour écarter des diagnostics différentiels.

Il est important de connaître l'historique du patient notamment une greffe de cellules souches hématopoïétiques (afin d'exclure la maladie du greffon contre l'hôte, GVH), un phénomène de Raynaud et une dysphagie (observés dans les sclérodermies mais pas dans la FSN), la présence de douleur, prurit, et d'insuffisance veineuse chronique (cohérentes avec une lipodermatosclérose). Quelques exemples de diagnostics différentiels fréquents sont décrits ci-dessous.

3.4.1 Sclérodermie

Il existe deux formes principales de **sclérodermies** : la forme localisée, purement dermatologique et appelée plus couramment « morphées » et, la forme généralisée, multiviscérale appelée sclérodermie systémique. Il s'agit d'une maladie orpheline.

Les **morphées** sont associées à une sclérose cutanée et une fibrose du derme. Il n'y a pas d'atteinte viscérale et de phénomène de Raynaud, contrairement à la sclérodermie systémique. Il existe 3 types de morphées : les morphées en plaques, les morphées linéaires et les morphées généralisées (Francès et coll., 2010). La cause des morphées a été peu étudiée, mais une origine auto-immune est suggérée (Takehara et Sato, 2005). Les morphées n'évoluent pas en sclérodermie systémique. L'incidence de la maladie est plus importante chez les femmes que chez les hommes (sex-ratio de 2 à 3 pour 1).

La **sclérodermie systémique**, nommée également **sclérose systémique (SSc)**, est une affection généralisée des artéioles, des microvaisseaux (phénomène de Raynaud) et du tissu conjonctif, caractérisée notamment par une fibrose et une oblitération vasculaire dans la peau et d'autres organes, en particulier les poumons, le cœur, les reins et l'appareil gastro-intestinal. Il existe 3 grands types de SSc : les SSc sans atteinte cutanée, les SSc avec atteinte cutanée diffuse et les SSc avec atteinte cutanée limitée.

Elle concerne tous les âges, mais débute généralement entre 30 et 50 ans. Son incidence est quatre à cinq fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes (site internet 4).

La cause exacte de la SSc n'est pas connue. Il s'agit d'une maladie auto-immune.

Les aspects cliniques de la peau et histopathologiques typiques de la SSc sont présentés à la **Figure 52**.

Les patients souffrants de SSc présentent des signes cliniques ou histopathologiques supplémentaires permettant d'exclure la FSN. En effet, ils ont un syndrome de Raynaud, des mégacapillaires et des autoanticorps positifs.

A l'examen histologique, la sclérodermie peut être différenciée de la FSN car l'hypercellularité est moins marquée, l'infiltrat lymphocytaire est important, l'expression de CD34 est faible et les fibres de collagène sont plus homogènes (Cowper et coll., 2008).

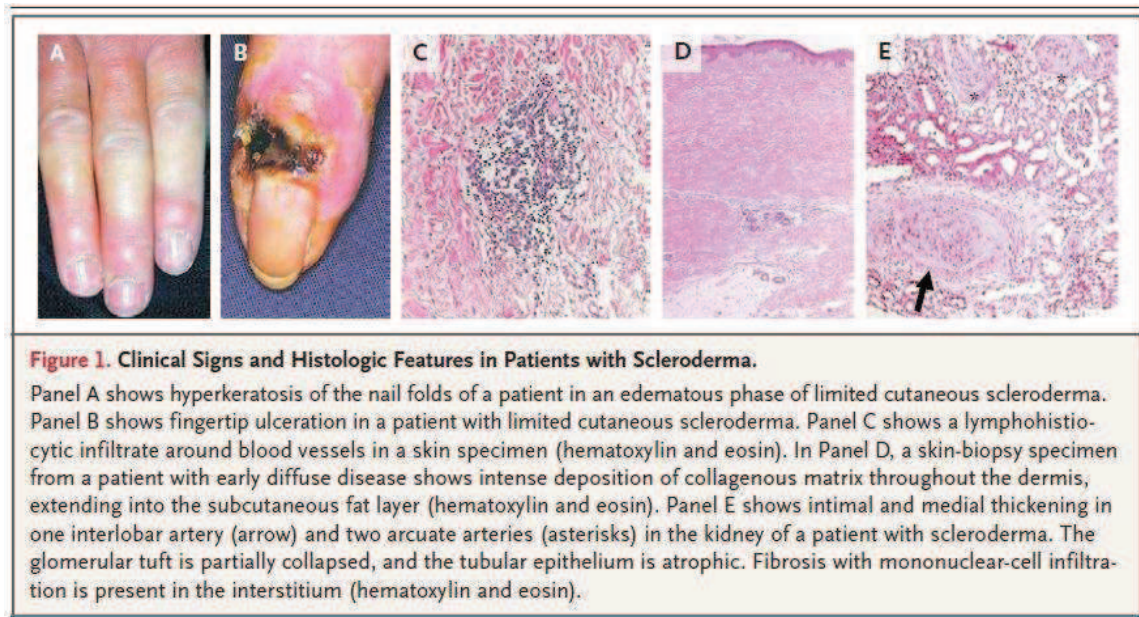


Figure 52 : Aspects cliniques et histopathologiques de la sclérodémie (Gabrielli et coll., 2009)

3.4.2 Scléromyxœdème

Le **scléromyxœdème** est une maladie rare, caractérisée par des dépôts importants de mucine et une fibrose (prolifération fibroblastique). Il consiste en une éruption symétrique et étendue de papules fermes et cireuses, qui se développe principalement au niveau des bras, des mains et parfois au niveau des jambes et du tronc (Brown-Maher et Nguyen, 2004). Il peut atteindre le visage, contrairement à la FSN (Cowper et coll., 2008). D'autres organes peuvent être également touchés, induisant une dysphagie, une faiblesse musculaire proximale, une neuropathie périphérique ou une maladie pulmonaire restrictive ou obstructive (Brown-Maher et Nguyen, 2004).

Le scléromyxœdème est associé à une gammopathie monoclonale et évolue vers un myélome dans moins de 10 % des cas (Igreja et coll., 2012).

Les cellules fusiformes CD34/collagène I positives sont absentes, ce qui permet de faire le diagnostic différentiel avec la FSN.

3.4.3 Lipodermatosclérose

La **lipodermatosclérose** est une infiltration scléreuse des jambes, souvent très douloureuse. Elle apparaît fréquemment chez les patients atteints d'œdème, et est pratiquement toujours associée à une insuffisance veineuse.

3.5 Pronostic

Le pronostic de la FSN dépend bien évidemment de l'extension et de la sévérité de la fibrose. Le plus souvent, une **détérioration progressive** de l'état clinique est observée. Chez certains patients, l'évolution peut être très rapide. Cependant, il a été suggéré qu'une amélioration de la fonction rénale, due à une amélioration spontanée dans le cas d'insuffisance rénale

aiguë (IRA) ou suite à une transplantation rénale, puisse ralentir, voire même inverser, l'évolution naturelle de la maladie (Cowper, 2007).

Le **taux de mortalité** varie considérablement selon les études, allant **de 7,7 à 67 %** (Abu-Alfa, 2011).

3.6 Traitements

Il n'existe **pas de traitement reconnu** de la FSN. De nombreux traitements ont été testés avec des résultats variables (Schieren et coll., 2009). Il n'y a aucune recommandation de conduite thérapeutique.

3.6.1 Transplantation rénale

La FSN ne concernant que les insuffisants rénaux, il paraît judicieux de rétablir une fonction rénale normale. De nombreuses études ont montré des **améliorations** significatives des symptômes (lésions cutanées, contractures) **à la suite d'une transplantation rénale** (Bangsgaard et coll., 2011 ; Cuffy et coll., 2011 ; Jan et coll., 2003 ; Panesar et coll., 2008).

Cependant, les résultats sont aléatoires (**Tableau 19**) ; une **rechute** peut survenir consécutivement au rejet du greffon comme cela a pu être montré chez l'enfant (Auron et coll., 2006) ou chez l'adulte (Goddard et coll., 2007). Inversement, une amélioration des lésions cutanées et/ou de la capacité ambulatoire a été observée chez deux patients après transplantation rénale. Ce gain clinique s'est maintenu après le rejet du greffon (Jan et coll., 2003) ou détérioration de la fonction rénale (Cuffy et coll., 2011).

La transplantation rénale est généralement considérée comme la meilleure option disponible à ce jour. Tous les patients ne sont malheureusement pas éligibles ; il est essentiel de rechercher des traitements alternatifs.

Tableau 19 : Effets de la transplantation rénale chez des patients atteints de FSN
HD : hémodialyse ; PD : dialyse péritonéale

Référence	Age/ sexe	Mode de dialyse	Résultats
Jan et coll., 2003	16F	HD (puis PD)	Légère amélioration de de l'œdème et du prurit
Jan et coll., 2003	8M	PD	Amélioration de lésions cutanées. Après rejet du greffon, pas d'aggravation des lésions.
Auron et coll., 2006	13M	PD	Aggravation des lésions cutanées
Panesar et coll., 2008	42	PD HD	Assouplissement de la peau et mobilité augmentée
Panesar et coll., 2008	34	HD	Assouplissement de la peau et mobilité augmentée
Panesar et coll., 2008	53	HD	Assouplissement de la peau et mobilité augmentée
Bangsgaard et coll., 2011	28F	PD	Amélioration des lésions cutanées et de la mobilité, disparition de la fibrose cutanée
Bangsgaard et coll., 2011	44F	PD	Diminution de l'épaisseur de la peau, amélioration des symptômes (particulièrement les douleurs neuropathiques et les démangeaisons) et de la mobilité
Cuffy et coll., 2011	58F	PD puis HD	Amélioration des lésions cutanées et de la capacité ambulatoire. Gain clinique maintenu après détérioration de la fonction rénale.

3.6.2 Plasmaphérèse

La **plasmaphérèse** est une technique de séparation et d'extraction du plasma. Le plasma obtenu peut être ensuite entièrement enlevé et remplacé par du plasma frais ou par de l'albumine à 5%.

Des résultats favorables ont été rapportés après plasmaphérèse chez 3 patients atteints de FSN ayant subi une transplantation hépatique (Baron et coll., 2003). Les lésions cutanées et les contractures articulaires ont régressé chez tous les patients. Néanmoins, deux des trois patients traités ont présenté une amélioration de la fonction rénale avant ou pendant la plasmaphérèse, ce qui induit un biais important puisqu'on ne peut pas définir la contribution de la fonction rénale dans l'amélioration clinique des patients. Une autre étude n'a montré aucun effet favorable chez quatre patients atteints de FSN (Hubbard et coll., 2003).

3.6.3 Photophérèse extracorporelle

La **photophérèse extracorporelle** est une autre technique d'aphérèse. Elle consiste à irradier *ex vivo* les cellules mononuclées, préalablement isolées, par des rayons ultraviolet A (UVA) en présence d'une molécule photoactivable, le 8-méthoxypsoralène. Les cellules traitées, en

particulier les lymphocytes T, sont ensuite réadministrées et peuvent ainsi réduire la prolifération des nouveaux lymphocytes T.

Plusieurs études ont montré des effets favorables avec ce traitement même si les résultats semblent variables (**Tableau 20**) (Gilliet et coll., 2005 ; Kintossou et coll., 2007 ; Linfert et coll., 2008 ; Mathur et coll., 2008 ; Pesek et coll., 2006 ; Richmond et coll., 2007). Il s'agit d'une méthode lourde et coûteuse mais qui a l'avantage d'être bien tolérée. Elle pourrait donc être une option thérapeutique intéressante.

Tableau 20 : Cas de patients atteints de FSN ayant reçu un traitement par photophérèse extracorporelle (d'après Linfert et coll., 2008).

Study	n	ECP treatment	Course
Mackay-Wiggan et al. (3)	2	1 – Concurrent plasmapheresis 2 – 18 months of therapy. Also had renal recovery	1 – Slow improvement but died of infectious complication 2 – Improvement in skin findings and mobility
Lauchli et al. (2)	1	1 cycle/2 weeks for 4 cycles	Significant improvement with ongoing renal dysfunction
Hershko et al. (38)	1	Not described	Improved skin and joint symptoms
Gilliet et al. (39)	3	1 cycle/2-4 weeks	3/3 improvement after 4 cycles, 1/3 complete regression after 16 cycles
Auron et al. (9)	1 ped.	1 cycle/2 weeks for 1 year	Improvement in setting of renal dysfunction (NSF onset after kidney transplant)
Wahba et al. (40)	1	1 cycle every 2 weeks × 2 months then 1 cycle per month	Improvement in symptoms and skin lesions
Richmond et al. (4)	5	Average 17 cycles/patient over mean of 8.5 months	3/5 mild improvement in skin tightness and range of motion

1 cycle = 2 treatments on consecutive days. NSF, nephrogenic systemic fibrosis.

3.6.4 Photothérapie (UVA thérapie)

La **photothérapie** consiste en l'irradiation du corps ou des zones lésées par des rayons ultraviolets (UVA ou UVB). Cette technique est classiquement utilisée en dermatologie pour le traitement de l'eczéma ou du psoriasis même si elle est parfois discutée par manque d'études convaincantes (Dereure, 2004). La photothérapie avec des rayons UVA1 (340 à 400 nm) a eu des résultats intéressants dans certaines maladies fibrosantes comme la maladie du greffon contre l'hôte ou les morphées (Dawe, 2003 ; Simon et coll., 2000).

Quatre cas d'améliorations ont été observés après un traitement par photothérapie aux UVA1 chez des patients souffrant de FSN (Tran et coll., 2009). Une amélioration dans l'intensité de l'induration de la peau a été notée chez tous les patients ; une amélioration de la mobilité des mains et des jambes a été observée chez deux patients. Il faut toutefois souligner que cette étude ne concerne qu'un nombre restreint de cas.

La photothérapie présente également l'avantage d'être un traitement bien toléré.

3.6.5 Imatinib (Glivec®)

L'**imatinib** est commercialisé sous le nom de **Glivec®** (France) ou **Gleevec®** ailleurs. C'est un inhibiteur réversible de tyrosine kinases (TK) par compétition simple vis à vis de l'ATP. Il inhibe C-Abl avec une haute sélectivité ainsi que les récepteurs cellulaires c-KIT, c-FMS (CD115) et les récepteurs du PDGF (PDGFR α et β) (Soria et coll., 2011). L'inhibition de c-Abl par l'imatinib inhibe la transduction du signal consécutive à l'activation du récepteur de

TGF β , indépendamment de la voie des SMADs. Le blocage de PDGFR par l'imatinib aboutit au même effet inhibiteur de la synthèse des macromolécules de la MEC (telles que le collagène I et IV ou la fibronectine).

Kay et High (2008) ont publié deux cas de rémission des symptômes (réduction de l'épaississement cutané et amélioration des contractures) sous traitement par l'imatinib (**Figure 53**). Ces mêmes auteurs ont breveté l'utilisation de l'imatinib pour le traitement de la FSN chez l'insuffisant rénal (WO2009117024 [A1]).

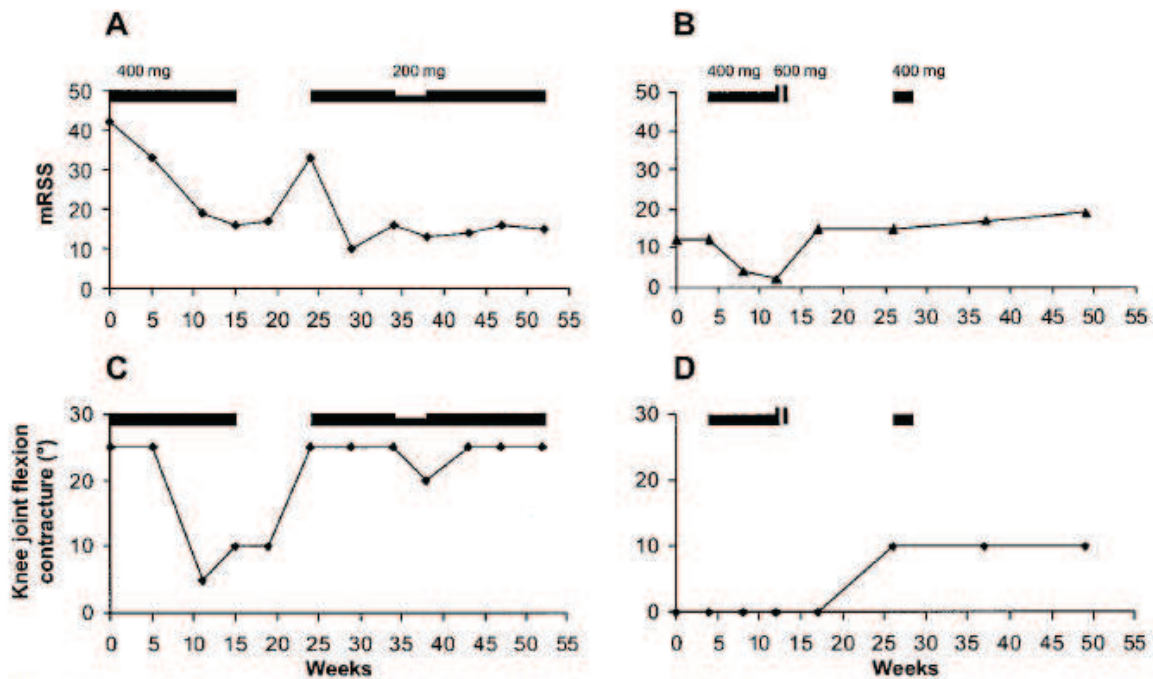


Figure 53. A and B, Changes in the modified Rodnan skin thickness score (MRSS) over time in patient 1 (A) and patient 2 (B) with imatinib mesylate treatment. C and D, Changes in knee joint flexion contractures over time in patient 1 (C) and patient 2 (D) with imatinib mesylate treatment. The daily dose of imatinib mesylate is indicated on the solid bar above each graph.

Figure 53 : Suivi de l'épaisseur de la peau (score de Rodnan modifié : A et B) et de la flexion du genou (degré de contracture, mesuré au goniomètre) (C et D) au cours du traitement à l'imatinib chez deux patients (patient 1 : A et C ; patient 2 : B et D) atteints de FSN (d'après Kay et High 2008).

Par la suite, d'autres auteurs ont également montré un effet favorable de l'imatinib chez des patients atteints de FSN (Chandran et coll., 2009), y compris à faible dose (Elmholdt et coll., 2011a et 2011b). Au total, sur 8 patients publiés à ce jour, 7 patients sont considérés comme étant répondeurs au traitement. Néanmoins, les critères d'évaluations varient d'une étude à l'autre. De plus, l'imatinib peut induire des effets indésirables importants (nausées, complications hépatiques et toxicité cardiaque) nécessitant l'arrêt du traitement. Pendant les périodes d'interruption du traitement, les symptômes de la FSN peuvent réapparaître (Elmholdt et coll., 2011a ; Kay et High 2008) (**Figure 53**).

3.6.6 Autres traitements

D'autres traitements ont également été testés sur des petites séries et/ou avec des résultats décevants (**Tableau 21**).

Tableau 21 : Exemples d'autres traitements testés chez des patients souffrant de FSN

Traitement	Auteurs	Année	Nb patients	Résultats
Corticoïdes	Jain et coll.,	2004	2	<ul style="list-style-type: none"> Amélioration chez l'enfant.
	DiCarlo et coll.,	2006	1	
	Jan et coll.,	2003		<ul style="list-style-type: none"> Aucune amélioration.
	Auron et coll.,	2006		
	Hubbard et coll.,	2003		
	Ting et coll.,	2003		
Hancox et coll.,	2003			
Perazella et coll.,	2003	1	<ul style="list-style-type: none"> Aggravation de la FSN. 	
Wahba et coll.,	2007			
Thalidomide	Moschella et coll.,	2004	3	<ul style="list-style-type: none"> Assouplissement de la peau
Immunoglobulines	Chung et Chung	2004	1	<ul style="list-style-type: none"> Après le 1^{er} cycle de traitement : amélioration de la locomotion. Pas d'amélioration après le 2^e et le 3^e cycle.
Thiosulfate de sodium	Yerram et coll.,	2007	1	<ul style="list-style-type: none"> Amélioration significative de la décoloration cutanée, de la douleur et des contractures. Amélioration des lésions cutanées et des contractures.
	Kadiyala et coll.,	2009	3	
Rapamycine	Swaminathan et coll.,	2010	1	<ul style="list-style-type: none"> Réduction de l'œdème, de l'induration de la peau et de la douleur.
Aléfacept	Robinson et coll.,	2011	2 sur 3	<ul style="list-style-type: none"> Amélioration des lésions cutanées Amélioration des contractures Stabilisation des lésions cutanées
			1 sur 3	
			1 sur 3	

La rareté de la FSN rend l'étude de son traitement difficile.

3.7 Facteurs associés à la FSN

3.7.1 Les complexes de gadolinium

3.7.1.1.1 Mise en évidence du lien entre les CGs et la FSN

Un néphrologue autrichien, **Thomas Grobner**, a suggéré, pour la première fois, en **janvier 2006**, un lien causal entre la FSN et l'exposition au préalable à un agent de contraste à base de gadolinium après avoir observé que **5 patients dialysés** sur une série de 9 avaient développé une FSN après administration d'un CG linéaire et non ionique, le **gadodiamide** (Omniscan[®]) (Grobner, 2006). En **août 2006**, une équipe danoise a ensuite publié une série de **13 cas de FSN** chez des patients avec une insuffisance rénale sévère ayant tous reçu du **gadodiamide** (Marckmann et coll., 2006). Depuis, de très nombreuses publications ont confirmé le lien causal entre certain CG et la survenue de la maladie (Collidge et coll., 2007 ; Deo et coll., 2007 ; Othersen et coll., 2007 ; Marckmann et coll., 2007 ; Mendoza et coll., 2006 ; Shabana et coll., 2008).

Il est très difficile de prouver le lien de causalité entre une maladie et un agent donné. Les critères, définis par Austin Bradford Hill en 1965 (Hill, 1965), sont fréquemment cités (mais aussi parfois contestés) :

1. **Force de l'association** (risque relatif). Si toutes les individus souffrant d'une maladie ont été exposés à l'agent pathogène présumé, mais que très peu de ceux appartenant au groupe témoin l'ont été, l'association est jugée forte. En termes quantitatifs, plus le risque relatif est important, plus la causalité de l'association est probable ;
2. **Cohérence** (répétition des observations dans différentes populations) ;
3. **Spécificité** (une cause produit un effet) ;
4. **Relation temporelle**. L'exposition à la cause présumée doit précéder l'apparition de la maladie ;
5. **Relation dose-effet** ;
6. **Plausibilité biologique** ;
7. **Preuve expérimentale** (chez l'Animal ou chez l'Homme) ;
8. **Analogie** (possibilité d'explications alternatives).

Ces critères ont été discutés dans le cas de la FSN (Kurtkoti et coll., 2008). De nombreux critères sont validés concernant les CGs, tels que la cohérence, la preuve expérimentale, la relation dose-effet ou la plausibilité biologique. En effet, la FSN est très rarement observée chez des patients sans exposition au préalable à un CG, suggérant une association forte entre ces molécules et la maladie. Cependant, il est difficile de savoir si l'exposition au CG a lieu dans une période pertinente car la durée entre la dernière administration et les premiers symptômes de la FSN est très variable.

En 2009, une méta-analyse d'études recherchant un lien entre la FSN et un CG quelconque (144 études identifiées, 7 études retenues concernant 4276 patients insuffisants rénaux

ayant bénéficié d'une IRM injectée) a étudié le rôle causal du Gd (Agarwal et coll., 2009). L'association a été estimée forte et cohérente pour les CGs en général mais particulièrement pour le gadodiamide. Cette analyse n'a cependant pas permis de différencier les différentes catégories de CGs à cause du faible nombre de cas cités dans la littérature.

A ce jour, le lien causal entre les CGs et la maladie est considéré comme hautement probable par les autorités de santé et la communauté scientifique. Par ailleurs, la quasi-disparition de la maladie après la mise en place de mesures de précaution (type de CG administré, doses...) confirme ce lien de causalité (Wong, 2012).

Enfin, la grande majorité des auteurs s'accordent à dire que le risque dépend de la catégorie de CG utilisé et soulignent l'excellent profil des CGs macrocycliques.

3.7.1.1.2 Détection de Gd dans les biopsies

La **présence de dépôts de gadolinium** a été constatée au moyen de diverses techniques (microscopie électronique couplée à la spectroscopie rayons X à dispersion d'énergie ; la microscopie à rayons X synchrotron fluorescents couplée à la spectroscopie d'absorption aux rayons X « EXAFS ») dans **des biopsies de peau** de patients souffrant de FSN et ayant reçu un **CG linéaire** (Abraham et coll., 2008 ; Boyd et coll., 2007 ; George et coll., 2010 ; High et coll., 2007). La technique de microscopie électronique couplée à la spectroscopie rayons X à dispersion d'énergie de visualisation des dépôts de Gd a pu également permettre de confirmer les expositions antérieures à un CG quand l'historique d'imagerie était inconnu ou incorrect (Weiss et coll., 2007).

Ces dépôts de Gd observés dans la peau suggèrent la **présence de Gd sous forme insoluble**. De plus, le Gd est souvent associé à **du phosphate** ou à **du calcium**, parfois à du fer et du zinc (Abraham et coll., 2008 ; Boyd et coll., 2007 ; George et coll., 2010 ; High et coll., 2010 ; Thakral et Abraham, 2009). Thakral et Abraham (2009) ont démontré que les dépôts de Gd pouvaient être situés dans des **fibroblastes** et des **macrophages** (Figure 54).

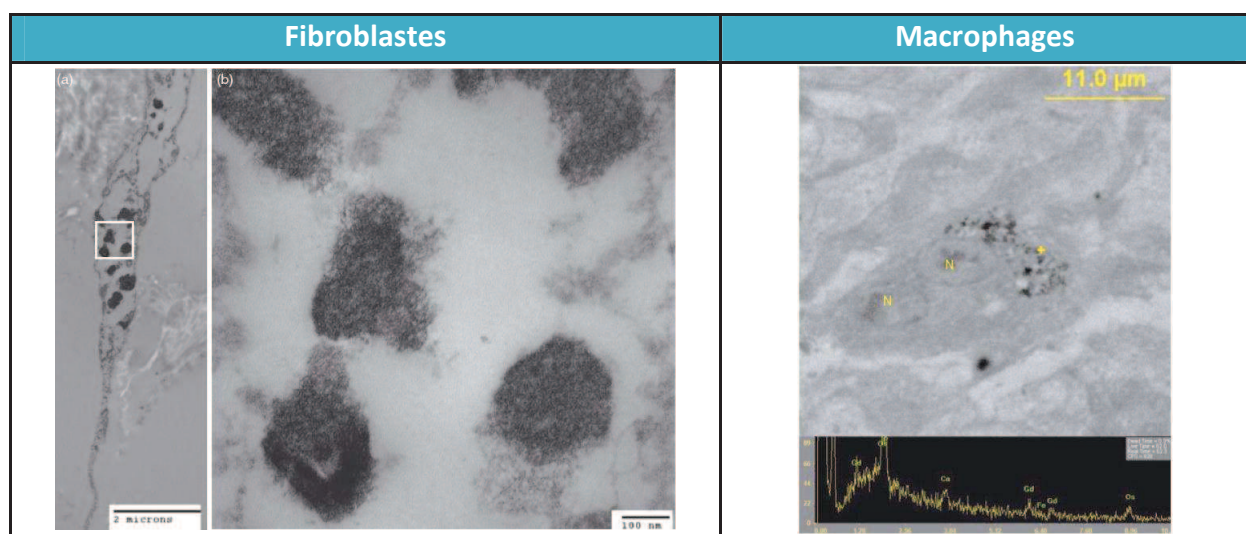


Figure 54 : Dépôts cutanés de Gd dans des fibroblastes ou des macrophages chez des patients souffrant de FSN (par microscopie électronique à transmission) (Thakral et Abraham, 2009)

Des dépôts de Gd ont également été retrouvés dans d'autres organes que la peau, tels que le **cœur, le foie, les poumons, l'intestin, les muscles squelettiques, le rein, l'œil, les méninges, le cervelet**, et la paroi des **vaisseaux sanguins** (Barker-Griffith et coll., 2011 ; Sanyal et coll., 2011 ; Swaminathan et coll., 2008). En revanche, aucune des études disponibles à ce jour n'a permis de définir formellement la forme (complexée, dissociée avec présence de Gd soluble ou insoluble) du Gd présent dans les biopsies, les méthodes analytiques utilisées ne le permettant pas.

Néanmoins, il reste quelques cas où l'exposition au préalable au gadolinium n'a pas pu être mise en évidence (Broome et coll., 2008 : 5 patients mais il s'agit d'une revue de la littérature incluant les 2 patients de Wahba 2007 ; Lemy et coll., 2010 : 1 patient sur 6 ; Song et coll., 2009 : 2 patients ; Wahba et coll., 2007 : 2 patients). Cependant, dans une série de 7 patients dont 6 indiquaient n'avoir jamais été exposés à un CG, des concentrations élevées de Gd ont été retrouvées dans la peau de 3 d'entre eux (par la technique de microscopie électronique couplée à la spectroscopie rayons X à dispersion d'énergie) (Deng et coll., 2010).

Deux études ont suggéré un **lien entre les foyers de fibrose et la présence de Gd** dans la peau des patients atteints de FSN :

- L'examen de biopsies cutanées de deux patients en spectrométrie de fluorescence X a montré une concordance entre des dépôts de Gd et des foyers de fibrose (High et coll., 2010) (**Figure 55**).

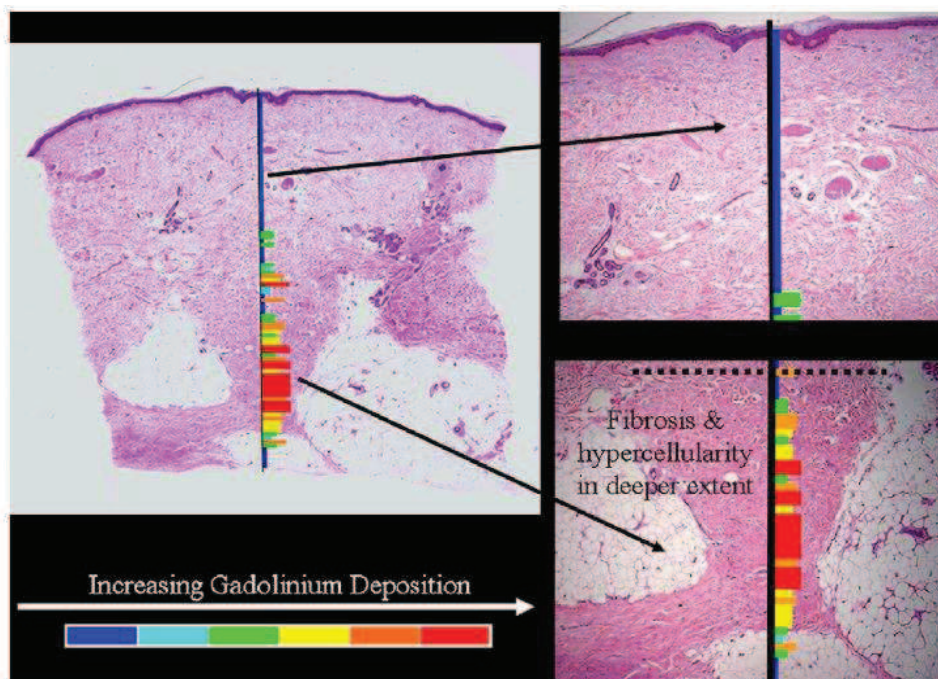


Figure 55 : Carte des concentrations de Gd (par spectroscopie de fluorescence RX) et des zones de fibrose (coloration H&E) (d'après High et coll., 2010).

- Dans une autre étude (Christensen et coll., 2011), pour chacun des 13 patients souffrant de FSN, la concentration cutanée de Gd était significativement supérieure ($p = 0,04$) dans les zones lésées par rapport à celle observée dans les zones non lésées (moyenne des 13 patients : $71,4 \pm 89,4$ ng/mL vs. $10,2 \pm 19,9$ ng/mL ; respectivement).

3.7.1.1.3 Cas de FSN

Il existe deux types de cas de FSN : les **cas dits « purs »** (ou « non confondus »), où le patient a reçu qu'un seul type d'agent de contraste à base de gadolinium, et les **cas dits « confondus »** (ou mixtes), pour lesquels le patient a reçu plusieurs produits de contraste (identiques ou non) avant de développer la maladie.

Il est très difficile de connaître la prévalence exacte de la FSN dans le monde.

La prévalence peut être surestimée car certains cas sont publiés plusieurs fois. La FSN est également proche de certaines pathologies, conduisant ainsi à une surévaluation ; des lésions cutanées sont ainsi fréquemment observées chez des patients insuffisants rénaux (Cordova et coll., 2009), particulièrement chez les hémodialysés (Markova et coll., 2012).

A l'inverse, une sous-estimation est aussi possible car cette maladie est très difficile à diagnostiquer et elle n'est pas connue de tous les praticiens. La qualité de la veille de pharmacovigilance intervient probablement. Ainsi, la **FDA** rapportait en 2010 environ **1600 cas de FSN** dans sa base de données (dont 600 cas estimés « purs »), **4%** de ces cas ont été rapportés par **2 hôpitaux au Danemark** et **93%** des cas concernaient **60 hôpitaux aux Etats-Unis** (Bennett et coll., 2012). Il est donc probable que certains patients soient décédés avant d'avoir pu être diagnostiqués.

Selon Pirovano et coll. (2012), **801 cas de FSN** (dont 444 dits « purs ») ont été publiés mais il est probable qu'il ne s'agit là que d'une petite partie du nombre de cas réels dans le monde.

On peut remarquer que les premiers de cas de FSN ont été identifiés en 1997 soit neuf ans après la mise sur le marché du 1^{er} CG (acide gadopentétique en 1988) et trois ans après l'obtention de l'AMM du gadodiamide (1994). Aucune étude n'a montré de cas avérés de FSN avant 1997 (Cowper et coll., 2007).

3.7.1.1.4 Type d'agent de contraste

Dans les cas de FSN « confondus », il est difficile de déterminer la responsabilité d'un type de CG en particulier. En revanche, il semble que la **quasi-totalité** des cas provoqués par un type unique de CG (cas « purs »), concerne les **CGs linéaires**, et plus particulièrement le **gadodiamide** et l'**acide gadopentétique**. En effet, l'European Medicine Agency (EMA, 2010) rapporte 583 de cas « purs » dont **75,1 %** sont associés au **gadodiamide** et **23,2%** avec l'**acide gadopentétique** (**Tableau 22**). Des résultats similaires ont été présentés ultérieurement (Pirovano, 2012) (**Tableau 22**).

Tableau 22 : Nombre de cas de FSN « purs » rapportés par l'EMA (2010) et par Pirovano (2012)

Nom commercial	Principe actif	EMA 2010 (583 cas « purs »)		Pirovano 2012 (444 cas « purs »)	
		Nombre de cas	Pourcentage (%)	Nombre de cas	Pourcentage (%)
Omniscan®	gadodiamide	438	75,1	348	78,2
OptiMARK®	gadoversétamide	7	1,2	6	1,3
Magnevist®	acide gadopentétique	135	23,2	88	19,8
MultiHance®	acide gadobénique	0	0	0	0
Gadovist®	gadobutrol	1	0,2	2	0,4
ProHance®	gadotéridol	1	0,2	0	0
Dotarem®	acide gadotérique	1*	0,2	1*	0,2

*Patient ayant reçu une administration d'un autre CG, avant l'injection de Dotarem® (Elmholdt et coll., 2011c) et donc ne pouvant être classé comme « pur » (on notera, de plus, l'absence de marquage CD34 dans le derme de ce patient).

Une étude rétrospective américaine a également montré une incidence 13 fois supérieure après administration de gadodiamide par rapport à l'acide gadopentétique (0,039% vs. 0,003%) (Wertman et coll., 2008). Cette étude concernait l'association entre la FSN et la nature des CGs ainsi que la relation avec la dose utilisée et cumulée, dans quatre centres comportant des services de transplantation rénale et de dialyse. Le gadodiamide était utilisé dans deux centres et l'acide gadopentétique était utilisé dans les deux autres. Les incidences estimées pour chaque produit (moyenne des 2 centres) ont ensuite été comparées.

Le gadodiamide ou l'acide gadopentétique sont systématiquement impliqués dans tous les cas confondus (Pirovano et coll., 2012).

Un cas avec l'acide gadobénique, un CG linéaire et ionique, a été rapporté dans une revue de la littérature (Rodby, 2011), sans être décrit. Deux cas de FSN sont décrits après administration unique de gadobutrol, un CG macrocyclique et non ionique (Elmholdt et coll., 2010 ; Wollanka et coll., 2009). Concernant **l'acide gadotérique**, à ce jour, il n'y a **aucun cas de FSN confirmé** où le patient **n'ait reçu que ce produit**.

3.7.1.1.5 Dose d'agent de contraste

Le **risque et la sévérité** de la FSN semblent liés à la **dose cumulée** de CGs. La majorité des cas est observée après plusieurs injections et suite à l'administration de fortes doses (dose double ou triple) (Abu-Alfa, 2011 ; Thomsen et coll., 2013), même si des cas de FSN sont apparus après administration unique de la dose clinique de 0,1 mmol/kg (Tsushima et coll., 2010).

Une étude rétrospective a analysé tous les patients sous dialyse de 2000 à 2006 en Ecosse (Collidge et coll., 2007). Le diagnostic de la FSN a été effectué chez 14 des 1826 patients

étudiés. Les patients souffrant de FSN ont reçu une dose cumulée de gadodiamide supérieure à celle des patients sans FSN (médiane de 0,36 contre 0,23 mmol/kg, $p < 0,008$). La dernière dose administrée était élevée et similaire pour les deux groupes (respectivement 0,21 et 0,20 mmol/kg, $p = 0,83$).

Ces données ont été confirmées par de nombreuses études (Heinz-Peer et coll., 2010 ; Kallen et coll., 2008 ; Lauenstein et coll., 2007 ; Prince et coll., 2008).

La dose cumulée de CG est également corrélée à la sévérité de la maladie (Marckmann et coll., 2007). Dans cette étude, les cas de FSN ont été divisés en 2 sous-catégories : les cas dits « sévères », pour lesquels les manifestations cutanées et les atteintes majeures entraînent une dégradation de la qualité de vie, et les cas dits « non sévères », pour lesquels les atteintes sont mineures. Les doses cumulées sont significativement plus élevées chez les patients avec une forme sévère de FSN (**Tableau 23**).

Tableau 23 : Dose cumulée moyenne de gadodiamide chez les patients souffrant de FSN
(* $p < 0,02$ vs. cas sévères ; ** $p < 0,01$ vs. cas sévères) (Marckmann et coll., 2007).

IRC : insuffisance rénale chronique

Dose cumulée (mmol/kg)	Cas de FSN « sévères » (n = 9)	Cas de FSN « non sévères » (n = 10)	Témoins insuffisants rénaux sans FSN (n = 19)
Chez les patients en IRC de stade 5	0,49 ± 0,06	0,33 ± 0,04*	0,31 ± 0,03
Sur toute la durée de la vie	0,57 ± 0,09	0,33 ± 0,04**	0,34 ± 0,04

3.7.2 L'insuffisance rénale

3.7.2.1 Insuffisance rénale et dialyse

3.7.2.1.1 Insuffisance rénale aiguë

L'IRA est définie par la perte **brutale** de la fonction rénale (Hoste et coll., 2009). Elle se caractérise par une **augmentation de la créatinémie** et souvent une **diminution rapide de la diurèse**.

3.7.2.1.2 Insuffisance rénale chronique

L'IRC est définie comme « une situation pathologique au cours de laquelle le rein ne peut accomplir tout ou partie de ses fonctions pendant une **période prolongée** » (Jacobs, 2008). Ce syndrome se caractérise par une **diminution permanente du DFG** au-dessous de 60 mL/min/1,73m². L'IRC est liée à une réduction permanente et définitive du nombre de néphrons fonctionnels (ce qui la distingue de l'IRA). D'après la classification de KDOQI (« Kidney Disease Outcomes Quality Initiative », 2002), elle est classée en **5 stades** selon sa gravité et le DFG (**Tableau 24**). L'IRC est dite « terminale » quand le recours à la dialyse

périodique ou à la transplantation rénale est nécessaire. L'insuffisance rénale peut être d'origine tubulaire, glomérulaire, interstitielle ou vasculaire.

Tableau 24 : Classification de l'insuffisance rénale chronique d'après les recommandations KDOQI (2002)

Stade	DFG (mL/min/1,73m ²)	Description
1	≥ 90	Maladie rénale chronique avec DFG normal ou augmenté
2	60-89	Maladie rénale chronique avec DFG légèrement diminué
3	30-59	Insuffisance rénale chronique modérée
4	15-29	Insuffisance rénale sévère
5	<15	Insuffisance rénale terminale

La fonction rénale est évaluée par le **DFG**. Il peut être mesuré ou estimé. Le calcul du débit de filtration glomérulaire est effectué par mesure de la clairance d'une substance exogène comme l'inuline ou des traceurs isotopiques. Cependant, ces techniques sont difficiles à utiliser en pratique clinique quotidienne. Le DFG est donc très **souvent estimé** à partir du dosage de la **créatinine plasmatique**. En effet, la créatinine est filtrée par les glomérules et est faiblement sécrétée par les tubules rénaux ; sa clairance (exprimée en mL/min) représente la filtration glomérulaire. Une réduction du DFG se traduira par une augmentation de la créatinine plasmatique. La créatinine étant produite à partir de la créatine par le métabolisme musculaire, il est important de corriger la créatinémie en fonction de l'âge, du sexe, de la race et du poids du patient. L'estimation du DFG peut donc être calculée. La formule de **Cockcroft et Gault** évalue la clairance de la créatinine. Cette formule tient compte du poids, de l'âge, du sexe et de la créatinine plasmatique. La formule dite « **MDRD** » (« Modification of Diet in Renal Disease ») évalue le DFG et prend en compte l'origine ethnique en plus. Cette dernière formule a une meilleure performance prédictive, particulièrement chez les sujets obèses et les personnes âgées. Aujourd'hui, elle est donc plus largement utilisée (Launay-Vacher et coll., 2012). Enfin, une troisième formule (CKD-EPI, ou « Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (Levey et coll., 2009) a été récemment proposée. Cette formule est meilleure pour l'évaluation des DFG normaux et élevés. En fait, aucune de ces formules ne permet l'évaluation de la fonction rénale dans l'IRA (Saab et Abu Alfa, 2007). Elles doivent être réservées aux patients stables. Dans l'IRA, on se contentera de la mesure de la créatininémie et du suivi de la diurèse.

Des manifestations cliniques et biologiques associées à l'IRC sont très courantes (anémie, ostéodystrophie, hypertension artérielle, protéinurie, hématurie, hypocalcémie, hyperphosphatémie, hyperparathyroïdie, acidose, hyperkaliémie etc.).

La majorité des insuffisants rénaux chroniques souffrent d'**anémie**. L'anémie de l'IRC est principalement due à une diminution de la production rénale d'**érythropoïétine** (EPO), un

facteur de croissance (produit à 90% par les reins) qui stimule la différenciation des cellules souches hématopoïétiques intra-médullaires vers les lignées érythrocytaires matures. Cette insuffisance de sécrétion d'EPO est également souvent associée à d'autres carences comme celle du **fer**. L'anémie associée à l'insuffisance rénale est généralement de type **normochrome normocytaire**, mais pas systématiquement.

L'anémie associée à l'IRC peut entraîner une augmentation du débit cardiaque, une hypertrophie ventriculaire et, finalement, un dysfonctionnement systolique avec insuffisance cardiaque. Il est donc important de traiter cette anémie. Ce traitement, consistant en l'administration d'EPO souvent en association avec du fer par voie intraveineuse, permet d'augmenter le taux de survie des patients et d'améliorer leur qualité de vie.

Des modifications du **métabolisme phosphocalcique**, ainsi que leurs conséquences sur le tissu osseux, sont fréquemment observées chez les patients souffrant d'IRC. Aux stades précoces de l'IRC, une réduction de la production de calcitriol (forme active de la vitamine D) par le rein et une augmentation d'excrétion rénale de phosphate sont observées. A ce stade, la phosphatémie tend à être basse ou normale. La diminution du calcitriol circulant induit une **hypocalcémie** et une hypersécrétion de PTH (hormone parathyroïdienne) (le calcitriol est un inhibiteur de la PTH). A un stade plus avancé (stade 4 ou 5), la diminution irréversible de la synthèse du calcitriol et la forte diminution des capacités du rein à éliminer le phosphore entraînent une **hyperphosphatémie**, qui joue également un rôle important dans **l'hyperparathyroïdie secondaire** et dans **l'ostéodystrophie rénale**. L'hyperphosphatémie favorise également la formation de **calcifications** artérielles et vasculaires, pouvant avoir des conséquences cardiovasculaires.

3.7.2.1.3 L'hémodialyse

L'**hémodialyse** est une méthode d'épuration du sang. Lors d'une insuffisance rénale terminale, l'organisme ne peut plus éliminer certaines substances et se charge donc progressivement de ces substances, qu'il est nécessaire d'éliminer par la dialyse. L'hémodialyse consiste à mettre en contact le sang avec une solution d'électrolytes (le dialysat) dont la composition est proche de celle du plasma, à travers un filtre placé dans un circuit extracorporel. Généralement, le traitement comporte trois séances de dialyse par semaine, chacune durant environ 4 heures.

3.7.2.1.4 Dialyse péritonéale

La **dialyse péritonéale** consiste à réaliser des échanges entre le sang de la membrane péritonéale et le dialysat introduit et retiré à intervalles réguliers dans la cavité péritonéale. Le dialysat est ensuite vidangé (drainé) avant de recommencer le cycle.

Le cathéter est généralement mis en place chirurgicalement et maintenu de façon permanente. Les cycles sont effectués en moyenne quatre fois par 24 heures (au final, environ 10 litres par jour) de façon manuelle ou automatisée. Il existe des facteurs de risque

(insuffisance respiratoire sévère, déficience de la paroi abdominale etc.) qui peuvent conduire à récuser un traitement par dialyse péritonéale. Si ces facteurs de risque sont pris en compte, la dialyse péritonéale n'est pas plus dangereuse que l'hémodialyse.

3.7.2.2 Insuffisance rénale et CGs :

La FSN est observée **uniquement** chez des patients souffrant d'IRC ou d'IRA et très majoritairement chez ceux traités par dialyse (80 %), principalement chez les hémodialysés (Cowper, 2007) (**Figure 56**). La quasi-totalité des cas sont décrits chez des patients présentant une IRC sévère (stade 4) ou terminale (stade 5) (Abu-Alfa, 2011). A ce jour, aucun cas n'a été démontré avec certitude chez des patients avec une IRC de stade 3, à l'exception, peut-être, d'un cas chez un patient dont le DFG était de 40 mL/min/1,73m². Ce dernier cas est cependant mal documenté (Swaminathan et Shah, 2007). Deux cas de FSN ont été suggérés chez des patients avec une insuffisance rénale de stade 3 (Sadowski et coll., 2007). Cependant ils ont été par la suite discutés car la formule MDRD utilisée pour évaluer l'insuffisance rénale de ces patients n'est pas pertinente, la fonction rénale n'étant pas stable chez ces patients en insuffisance rénale aiguë (Saab et Abu-Alfa, 2007).

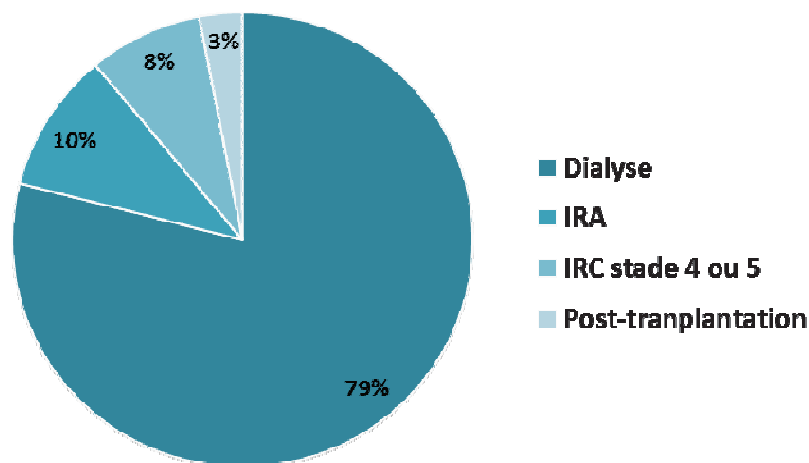


Figure 56 : Répartition (en pourcentage) des cas de FSN chez les insuffisants rénaux (selon Cowper 2011-2009)

Le rôle de l'insuffisance rénale dans le mécanisme de la FSN semble principalement dû à une rétention importante du CG, les reins ne pouvant plus l'éliminer. La demi-vie d'élimination des CGs est logiquement très augmentée en cas d'IRC ; elle est quatre fois plus longue chez les patients de stade 3 et, encore plus longue chez les patients de stade 4 ou 5. Par exemple, la demi-vie d'élimination de l'acide gadotérique passe de 1,6 heures chez le volontaire sain à 5,1 heures chez le patient avec une IRC de stade 3 et enfin à 13,9 heures chez le patient avec une IRC de stade 4 (**Figure 57**). La demi-vie d'élimination peut aller jusqu'à plus de trente heures chez le patient avec une IRC de stade 5, dans le cas du gadodiamide (Joffé et Thomsen, 1998).

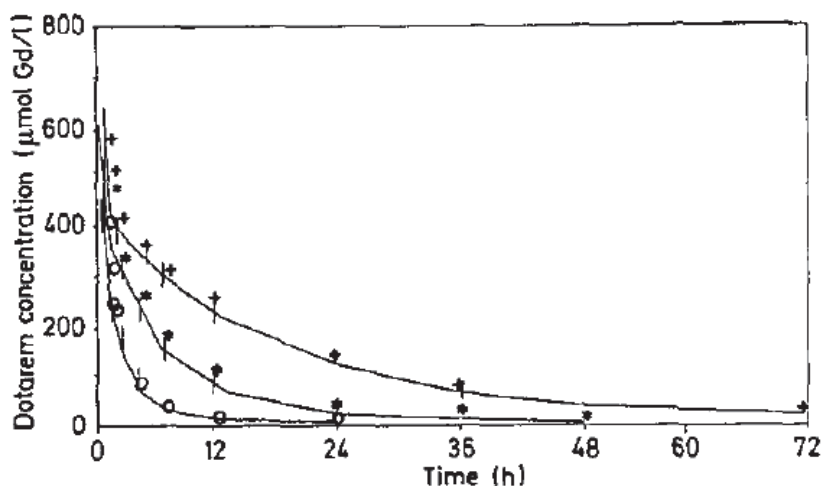


Figure 57 : Concentration plasmatique de Gd total en fonction du temps après injection de 0,1 mmol/kg d'acide gadotérique chez des volontaires sains (o) ou des sujets insuffisants rénaux avec une clairance de la créatinine entre 30-60 mL/min (*) ou comprise entre 10-30 mL/min (+) (Chachuat et coll., 1992)

Aucune étude n'a montré un risque plus important selon la cause de l'insuffisance rénale ou le traitement de dialyse utilisé. Cependant, certains auteurs suggèrent un risque accru dans le cas de la dialyse péritonéale (Abu-Alfa, 2011 ; Kallen et coll., 2008). La clairance des CGs est nettement plus lente avec la dialyse péritonéale, par rapport à celle de l'hémodialyse, ce qui pourrait expliquer un risque plus élevé dans le cas de la dialyse péritonéale (Joffé et Thomsen, 1998 ; Murashima et coll., 2008).

Tous les CGs sont dialysables : 68% sont éliminés après une session d'hémodialyse de 3 heures et, 98% après 3 sessions consécutives (Tombach et coll., 2002). Dans le cas de la dialyse péritonéale, cependant, seulement 75% sont éliminés après 5 jours (Abu-Alfa, 2011). Il est recommandé par la Food and Drug Administration (FDA, 2010) et l'American College of Radiology (ACR, 2012) de prévoir l'hémodialyse rapidement après l'administration du CG à des patients dialysés. En effet, une étude rétrospective a montré que le délai entre la dialyse et l'injection du CG est plus long chez les patients ayant développé une FSN que chez les patients sans FSN (Prince et coll., 2008) (**Tableau 25**). Néanmoins, il convient de noter que l'hémodialyse ne peut éliminer que les molécules solubles et non les dépôts insolubles, comme le phosphate de gadolinium.

Tableau 25 : Délai entre la dialyse et l'injection du CG chez des patients ayant développé une FSN ou non (d'après Prince et coll., 2008)

Patients	Nombre de patients	Délai entre la dialyse et l'injection du CG (jours)	Statistiques (valeur du p)
Patients avec FSN	9	5 [1 - 12]	p < 0,001
Patients sans FSN	270	0 [1 - 8]	

3.7.1 L'hyperphosphatémie

Une étude cas-témoin (Marckmann et coll., 2007) a montré **une concentration de phosphate sérique plus élevée** associée à une hypercalcémie chez les patients insuffisants rénaux ayant développé une FSN que chez des patients témoins ($2,22 \pm 0,12$ mmol/L vs. $1,81 \pm 0,10$ mmol/L, $p < 0,01$) (Figure 58).

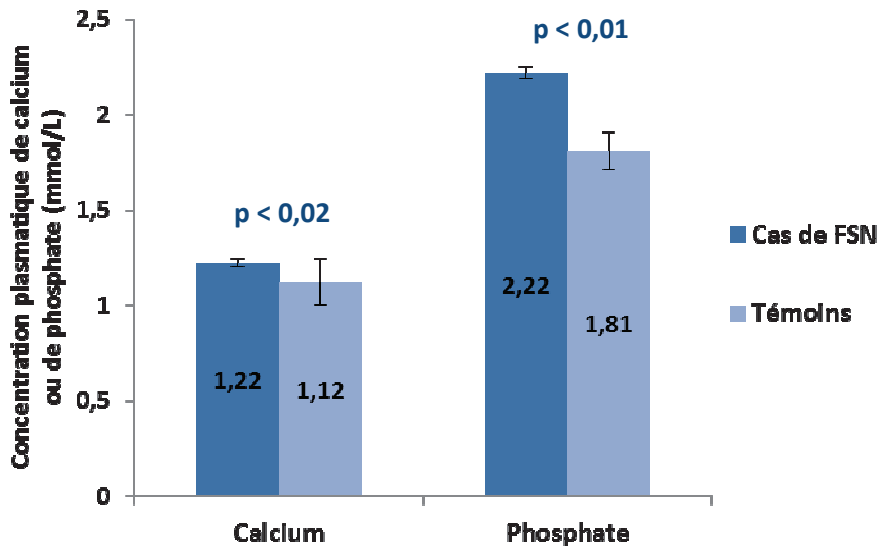


Figure 58 : Concentration plasmatique de calcium et de phosphate chez des patients souffrant de FSN ou uniquement insuffisants rénaux (Marckmann et coll., 2007)

Ces résultats ont été confirmés par une autre étude (Prince et coll., 2008). L'hyperphosphatémie est fréquente chez les patients en insuffisance rénale au stade terminal (voir 3.7.2.1.2 Insuffisance rénale chronique) ; le phosphate peut ainsi être retenu dans les différents compartiments de l'organisme. Il pourrait alors salifier le gadolinium et former des dépôts insolubles de phosphate de gadolinium, après dissociation du complexe et/ou après transmétallation avec un métal endogène. La technique de microscopie à rayons X et celle de microscopie électronique couplée à la spectroscopie rayons X à dispersion d'énergie ont permis de visualiser des dépôts de Gd associés à du phosphate suggérant la présence de phosphate de gadolinium dans différents organes (Boyd et coll., 2007 ; George et coll., 2010 ; Sanyal et coll., 2011). Ces nouveaux complexes ont une stabilité thermodynamique élevée ($\log K_{\text{cond}}$ de $\text{GdPO}_4 = 16,5$ (Robic et coll., 2011)), et pourraient jouer un rôle dans le mécanisme de la FSN (voir chapitre 3.10 Hypothèses mécanistiques).

3.7.2 Métabolisme du fer

3.7.2.1 Présence concomitante de gadolinium et de fer dans les organes de patients FSN

Plusieurs équipes ont montré la **co-localisation de dépôts de Gd et de fer** dans des biopsies cutanées issues patients souffrant de FSN (Abraham et coll., 2008 ; Abraham et Thakral

2008 ; High et coll., 2007 ; Schroeder et coll., 2008 ; Thakral et Abraham, 2009). Selon Miyamoto et coll., 2011, la détection de ces dépôts de fer, dans les fibrocytes du derme, pourrait être un outil utile pour le diagnostic de la FSN. En effet, ces dépôts ne sont observés que dans la FSN, et donc pas dans d'autres pathologies cliniquement proches telles que les sclérodermies (Miyamoto et coll., 2011). L'association de concentrations locales de fer, d'aluminium et de Gd élevées a été détectée dans d'autres organes que la peau, tels que le cœur et les vaisseaux sanguins chez trois patients (Swaminathan et coll., 2008).

3.7.2.2 Interaction entre les CGs et le métabolisme du fer

En 1988, une **augmentation transitoire de la concentration de fer** sérique a été rapportée chez des volontaires sains après administration d'acide gadopentétique (Magnevist[®], première formulation pharmaceutique) (Niendorf et coll., 1991 ; Niendorf et Seifert 1988) ainsi que de gadodiamide (Omniscan[®]) (Kaplan et coll., 1991). L'ajout d'un excès de ligand libre DTPA à la formulation pharmaceutique de l'acide gadopentétique (à la concentration de 1,0 mmol/L) a permis de normaliser les concentrations de fer sérique (Niendorf et coll., 1991, Niendorf et Seifert 1988). Dans le cas de l'acide gadotérique (Dotarem[®]), aucune modification de la sidérémie n'a été observée (Le Mignon et coll., 1990).

En 2003, Vorobiov et coll., ont montré, chez un patient insuffisant rénal en état de **surcharge martiale** et ayant reçu de **l'acide gadopentétique** (formulé avec l'excès de ligand libre DPTA), une importante augmentation de **la sidérémie** et de **la ferritinémie**. Par la suite, cette équipe a mis en évidence une augmentation de la concentration de fer dans des homogénats de foie de souris après incubation avec de l'acide gadopentétique. Sur un modèle de Rat rendu anurique avec une surcharge martiale, une augmentation de la sidérémie après exposition à l'acide gadopentétique a été observée (Vorobiov et coll., 2003).

Cependant, dans une étude rétrospective concernant 6 patients hémodialysés ayant reçu une administration d'acide gadopentétique (formulation commerciale), aucune modification du métabolisme du fer n'a été observée (Panesar et coll., 2010).

En 2007, Swaminathan a observé, chez deux patients ayant reçu du gadodiamide (Omniscan[®]) et développé une FSN, une diminution du TIBC (« Total Iron Binding Capacity » ou capacité totale de fixation du fer) et une **sur-saturation de la transferrine** ainsi qu'une **augmentation de la concentration en fer libre et de la ferritinémie**. De même, les résultats d'une étude rétrospective concernant dix patients ayant présenté une FSN après avoir reçu du gadodiamide sont cohérents avec cet effet (Swaminathan et coll., 2007). Néanmoins, on notera l'absence d'un groupe témoin, c'est-à-dire des patients ayant reçu une administration de gadodiamide sans avoir développé de FSN.

Dans une étude rétrospective, comparant les données biologiques pré et post-administration de CG chez des patients souffrant de FSN ou non, **aucune modification de**

métabolisme du fer n'a été observée. Selon les paramètres, entre 1 et 4 patients FSN étaient pris en compte, ainsi qu'entre 38 et 69 patients témoins insuffisants rénaux n'ayant pas développé la maladie (Prince et coll., 2008). Ces résultats ne sont donc pas cohérents avec ceux de l'étude de Swaminathan (2007).

Des données *in vitro* viennent confirmer l'hypothèse d'une interaction entre le fer et les CGs. En effet, le gadolinium ($GdCl_3$) et le gadodiamide (avec un plus faible effet) affectent l'homéostasie du fer dans différentes lignées cellulaires, augmentant la concentration intracellulaire de Gd ainsi que celle de la ferritine (Ghio et coll., 2011).

Chez le Rat rendu insuffisant rénal il a été récemment rapporté que l'acide gadotérique (injection unique de 1,5 mmol/kg) induit une baisse du TIBC, une élévation de la ferritine sérique et une sur-saturation de la transferrine ainsi que l'apparition d'un stress oxydant, réversible lors d'un traitement par N-acétyl-cystéine, un antioxydant. On notera que cette étude n'était pas comparative et qu'aucune lésion cutanée n'a été rapportée (Pereira et coll., 2012).

L'administration d'un chélateur oral du fer chez des rats insuffisants rénaux (néphrectomie des 5/6^e) prévient la fibrose cutanée, induite par l'injection de gadodiamide (Swaminathan, 2012) (communication personnelle).

Ces différentes données suggèrent une **transmétallation entre le Gd et le fer** *in vivo* après administration de complexes de gadolinium ayant une faible stabilité thermodynamique et/ou cinétique, selon l'équation générale :



La constante thermodynamique du Fe-DTPA-BMA (c'est-à-dire du ligand du gadodiamide associé à du fer) est plus élevée que celle du DTPA-BMA-Gd (gadodiamide, Omniscan[®]) (respectivement $\log K_{\text{therm}}$ 21,9 et 16,9). En effet, la formation de DTPA-BMA-Fe et la libération de Gd^{3+} « libre » est favorisée au détriment du complexe DTPA-BMA-Gd. La libération de Gd^{3+} « libre » pourrait entraîner la formation de Gd sous forme insoluble, détecté dans les biopsies de peau de patients souffrant de FSN. Un traitement par EPO pourrait majorer le risque (Hope et coll., 2009 ; Swaminathan et Shah, 2007).

3.7.3 Autres co-facteurs

Différents facteurs associés à la FSN ont été suggérés dans la littérature. Ils sont résumés dans le **Tableau 26** ci-dessous.

Tableau 26 : Cofacteurs associés à la FSN suggérés dans la littérature.

Cofacteurs associés à la F.S.N.	
Facteurs biologiques	Administration de produit
Insuffisance rénale sévère ou terminale (Abu-Alfa, 2011 ; Cowper, 2007) Dialyse (Sadowski et coll., 2007)	Administration d'un CG (Grobner, 2006 ; Marckmann et coll., 2006)
Transplantation rénale ou hépatique (Sadowski et coll., 2007)	Dose cumulée de complexes de gadolinium élevée (nombre d'exams injectés) (Marckmann et coll., 2007)
Concentration élevée de phosphate sérique (Marckmann et coll., 2007 ; Prince et coll., 2008)	Dose élevée d'érythropoïétine (Marckmann et coll., 2007 ; Swaminathan et coll., 2006)
Concentration élevée de calcium sérique (Marckmann et coll., 2007)	Administration de bêta-bloquants (Lemy et coll., 2010)
Événement pro-inflammatoire concomitant (chirurgie, infection, inflammation, événement vasculaire) (Sadowski et coll., 2007)	
Cathétérisme, thrombose (Sadowski et coll., 2007)	
Augmentation du métabolisme du fer (Swaminathan et coll., 2007)	

Les patients souffrant de FSN ont généralement reçu des **doses élevées d'EPO** afin de traiter l'anémie due à leur insuffisance rénale (Marckmann et coll., 2007 ; Swaminathan et coll., 2006). Ils ont reçu des doses importantes, probablement à cause d'une résistance à l'EPO qu'ils auraient développée (Swaminathan et coll., 2006). Or, l'EPO peut permettre le recrutement des fibrocytes circulants issus de la moelle osseuse et potentialiser leur activité (Haroon et coll., 2003 ; Santhanam et coll., 2008).

Un lien entre la FSN et un traitement par un **bêta-bloquant** a été suggéré (Lemy et coll., 2010). Dans cette série, 5 patients ont reçu concomitamment un bêta-bloquant. Les symptômes de la FSN se sont améliorés durant les phases d'arrêt du traitement. La fonction rénale des patients étaient stables. D'autres patients FSN traités avec un bêta-bloquant apparaissent dans la littérature (Evenepoel et coll., 2004 ; Hauser et coll., 2004 ; Obermoser et coll., 2004 ; Pryor et coll. ; 2007). Il a déjà été montré qu'un bêta-bloquant a des propriétés anti-fibrosantes (Ahmad, 1996).

En ce qui concerne **l'insuffisance hépatique**, 3 cas de FSN ont été rapportés chez des patients insuffisants rénaux ayant subi une transplantation hépatique (Maloo et coll., 2006). Cependant, des études plus récentes ont montré que l'insuffisance hépatique n'est pas un facteur de risque indépendant de FSN (Chow et coll., 2011 ; Mazhar et coll., 2009).

Après la mise en évidence du lien causal entre les CGs et la maladie chez l'insuffisant rénal, des craintes sont apparues concernant les **enfants de moins de 2 ans**. En effet, à cet âge, la fonction rénale est immature. Par exemple, chez le nouveau-né d'une semaine, le DFG est environ de 40 mL/min/1,73m² (ce qui équivaut au stade 3 de l'IRC chez l'adulte) alors qu'entre 2 et 8 semaines, le DFG est de 65 mL/min/1,73m² et chez l'enfant âgé de plus de 8 semaines, le DFG est à 95 mL/min/1,73m² (KDOQI, 2002 ; Hogg et coll., 2003). Cependant, il n'existe aucun cas rapporté de FSN chez l'enfant de moins de 2 ans, les premiers cas pédiatriques connus ont été identifiés chez des enfants de 8 ans (Jain et coll., 2004 ; Jan et coll., 2003).

3.8 Recommandations des autorités de santé

Les premières recommandations des autorités de santé européennes sont apparues un an après la mise en évidence du lien entre la FSN et l'administration au préalable d'un ou plusieurs CGs. En février 2007, le groupe de travail européen de pharmacovigilance de l'EMA (« European Medicines Agency ») a tout d'abord recommandé aux titulaires d'AMM de produits de contraste à base de gadolinium d'ajouter des avertissements concernant la survenue possible d'une FSN avec les CGs dans la rubrique « mises en garde spéciales et précautions d'emploi » (section 4.4) du Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP).

En décembre 2007, le Comité des Médicaments à usage Humain (« CHMP ») de l'EMA, a reconnu que le risque de développer une FSN dépendait du type de CG utilisé. Il a donc établi une classification des différents CGs en trois groupes de risque (**Tableau 27**) :

- **Risque élevé** : gadoversétamide (OptiMARK[®]), gadodiamide (Omniscan[®]) et acide gadopentétique (Magnevist[®], et ses génériques) ;
- **Risque modéré** : gadofosveset (Vasovist[®]), acide gadoxétique (Primovist[®]) et acide gadobénique (MultiHance[®]) ;
- **Risque faible** : acide gadotérique (Dotarem[®]), gadotéridol (ProHance[®]) et gadobutrol (Gadovist[®]).

En 2008, une procédure d'arbitrage a été lancée afin que le CHMP procède à une évaluation du risque de survenue d'une FSN pour tous les CGs autorisés, et qu'il recommande des mesures à prendre afin de diminuer ce risque. L'avis définitif du CHMP a été publié en novembre 2009 puis ratifié par une décision de la Commission Européenne en juillet 2010. Les CGs sont ainsi classés en trois catégories et des recommandations de prescription ont également été émises, qui diffèrent selon le niveau de risque (Tableau 27). Le rapport public d'évaluation soutient que, chez les patients souffrant d'insuffisance rénale sévère ou terminale, le risque de développer la maladie dépend du type de CG administré en fonction de ses « propriétés physico-chimiques [...] qui affectent l'importance de la libération de Gd³⁺ libre du complexe chélaté, et à leurs propriétés pharmacocinétiques qui influencent la durée pendant laquelle le produit de contraste reste dans le corps » (EMA, 2010). Le gadodiamide

(Omniscan[®]), l'acide gadopentétique (Magnevist[®]) et le gadoversétamide (OptiMARK[®]) sont strictement contre-indiqués chez les patients dont le DFG est inférieur à 30 mL/mn/1,73 m².

Le CHMP a également recommandé que le type et la dose du produit utilisé soient systématiquement reportés dans le dossier du patient.

Enfin, le CHMP a recommandé que des études soient effectuées par chaque compagnie commercialisant un CG afin de mieux comprendre cette maladie. Notamment, des études cliniques doivent être réalisées afin d'évaluer le potentiel de rétention à long terme du gadolinium dans l'os. Une étude clinique (étude BONE) impliquant tous les titulaires d'AMM (sauf Bracco) est en cours afin de mesurer la rétention du Gd dans la peau et l'os de patients insuffisants rénaux ayant bénéficié d'une IRM injectée. De plus, une revue cumulée des cas de FSN doit être soumise par chaque laboratoire, annuellement pendant 3 ans.

Dès 2006, l'autorité de santé américaine, la Food and Drug Administration (FDA), a alerté le public sur les cas de FSN rapportés chez des patients ayant reçu un CG (**Tableau 28**). En 2007, la FDA a demandé d'ajouter une mise en garde relative au risque de FSN sur le RCP de tous les CGs, sans les différencier. Cependant, en septembre 2010, la FDA a fait la distinction entre les différents types de CGs (FDA, 52010). Elle a ainsi publié sur son site internet une information de sécurité, exigeant de nouvelles informations dans le RCP des CGs, qui rejoignent celles demandées par l'EMA. La FDA classe les CGs en deux catégories de risque. Les CGs à haut risque (OptiMARK[®], Omniscan[®] et Magnevist[®]) sont contre-indiqués chez les patients présentant IRA ou une IRC sévère (Yang et coll., 2012).

Les autorités de santé japonaises, la Société Européenne de Radiologie Urogénitale (ESUR) (Thomsen et coll., 2013) et le collège américain de Radiologie (ACR, 2012) ont émis des recommandations similaires à celles de l'EMA et de la FDA.

Tableau 27 : Recommandations du CHMP pour les différents produits de contraste à base de gadolinium (EMA, 2010)

Risque Produit	RISQUE FAIBLE: Dotarem [®] , ProHance [®] , Gadovist [®]	RISQUE INTERMEDIAIRE: Primovist [®] , Vasovist [®] , MultiHance [®]	RISQUE ELEVE: Omniscan [®] , OptiMARK [®] , Magnevist [®]
Grossesse	Non recommandé, sauf si rapport bénéfice-risque favorable		
Allaitement	Suspendre 24h au moins		
Insuffisance rénale, transplanté hépatique et hémodialyse	Poursuivre ou suspendre 24h selon la décision de la mère (consultation du médecin)	Contre-indication chez l'IR sévère et le transplanté hépatique. Précaution chez l'IR modéré, selon rapport bénéfice-risque, utiliser la dose diagnostique minimum, 7 jours entre 2 IRMs	
	Précaution chez l'IR sévère et le transplanté hépatique: uniquement en utilisant la dose diagnostique minimum, 7 jours entre 2 IRMs	A éviter chez l'IR sévère et le transplanté hépatique. Si réalisée, utiliser la dose diagnostique minimum, 7 jours entre 2 IRMs	
Population pédiatrique	Bénéfice de l'hémodialyse en prévention ou traitement non démontré chez patient non dialysé, pourrait être utile chez patient dialysé		
	Précaution chez le nouveau-né, utiliser la dose diagnostique minimum, 7 jours entre 2 IRMs	Contre-indication chez le nouveau-né < 4 semaines	
Patient âgé	Précaution chez l'enfant < 1 an, dose diagnostique minimum, 7 jours entre 2 IRMs		
Screening fonction rénale	Important de rechercher un dysfonctionnement rénal chez patient > 65 ans		
	Dosage pour fonction rénale recommandé	Dosage pour fonction rénale obligatoire pour tous les patients	

Tableau 28 : Recommandations de la FDA de 2006 à 2010 pour les différents produits de contraste à base de gadolinium (Reiter et coll., 2012)

FDA 2006	FDA 2007	FDA 2010
	Boxed Warning for GBCAs	Change in Labeling for GBCAs
Patients at risk:	Patients at risk:	Patients at risk:
Moderate to end stage kidney disease (GFR < 60 ml/min/1.73 m ²)	Acute or chronic severe renal insufficiency (GFR < 30 ml/min/1.73 m ²)	Highest risk for patients with GFR < 30 ml/min/1.73 m ²
	Acute renal insufficiency due to hepatorenal syndrome or in the perioperative phase of a liver transplant	Repeated or high dosage GBCA enhanced procedures
		NO RISK: patients with normal kidney function
	Screen all patients for renal dysfunction (history and/or lab tests)	Screen all patients for renal dysfunction (history for assessment of acute kidney failure, lab tests for patients at risk for chronic renal failure) Risk factors are Diabetes, Hypertension, heart disease, smoking, obesity, high cholesterol, family history of kidney disease, age 65 or older, urinary tract infections/obstructions, systemic infections or autoimmune diseases [91]
Measures:	Measures:	Measures:
Carefully weigh pros and cons of GBCA enhanced imaging	avoid GBCA unless absolutely necessary	Gadodiamide, Gadoversetamid, Gadopentet. Acid are contraindicated for highest risk patients
Use alternative imaging if possible	do not exceed recommended dose	
	take the elimination half life into account and allow enough time for GBCA elimination before rescanning the patient	Avoid GBCAs in patients with impaired (known/suspected) drug elimination unless absolutely necessary
Consider prompt dialysis in all patients with impaired renal function	Consider prompt dialysis in patients that are already on dialysis treatment	Consider prompt dialysis in patients that are already on dialysis treatment
		Monitor patients after GBCA administration, good documentation, no repeat GBCA imaging procedures until GBCA is eliminated from the body

3.9 Prévalence et incidence : études cliniques

La **prévalence** de la FSN chez les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale est comprise entre 1,5 à 4,4 %, avec une moyenne de $2,87 \pm 1,01$ % (n = 1866 patients exposés) (Abu-Alfa, 2011). Cette prévalence a été calculée à partir de 6 séries de patients (Collidge et coll., 2007 ; Deo et coll., 2007 ; Lauenstein et coll., 2007 ; Marckmann et coll., 2006 ; Othersen et coll., 2007 ; Shabana et coll., 2008).

Les calculs d'**incidence** sont très variables d'une étude à l'autre et dépendent bien évidemment de la période étudiée (avant ou après les recommandations des autorités de santé et sociétés savantes).

Par exemple, trois cas de FSN ont été diagnostiqués chez 85 patients ayant reçu un CG et souffrant d'une insuffisance rénale de stade 5 traités par dialyse (Deo et coll., 2007). Le suivi des patients a été effectué sur une période de 18 mois (de Janvier 2005 à Juillet 2006). L'incidence calculée était de 4,3 pour 1000 années-patients. Le risque de développer une FSN était de 3,4% par patient et de 2,4% par examen avec injection d'un CG. Ces valeurs sont beaucoup plus faibles que dans l'étude initiale de Grobner (2006) où le taux d'incidence était de 55% mais cette étude a été effectuée sur une petite série.

Une revue de la littérature de tous les cas entre 2003 et 2008 a montré une incidence très différente avant et après la mise en place des recommandations de la FDA. En effet, entre 2003 et 2006, l'incidence était de 36,5 cas pour 100 000 procédures d'IRM avec injection d'un CG alors qu'après 2007, l'incidence n'était plus que de 4 cas pour 100 000 examens (Perez-Rodriguez et coll., 2009).

Deux études françaises ont été réalisées afin d'évaluer la prévalence et l'incidence de la FSN. Une étude rétrospective nommée **FINEST** (« Fibrose Néphrogénique SysTémique ») a été réalisée chez des patients en IRC ayant bénéficié d'une IRM (Janus et coll., 2010). Cette étude a été réalisée dans 9 centres français de néphrologie (de juillet 2005 à Juillet 2006). Les signes cutanés caractéristiques de la FSN ont été recherchés dans les dossiers des patients jusqu'à 4 mois après l'examen radiologique. Sur les 308 patients inclus, dont plus de la moitié présentaient une IRC de stade 5, aucune anomalie cutanée n'a été observée. La grande majorité de ces patients avaient reçu des CGs macrocycliques (76% avaient reçu de l'acide gadotérique).

Par la suite, une étude prospective, **Pro-FINEST**, concernant un plus grand nombre de patients, a été réalisée afin d'apporter des informations plus précises quant à l'incidence de la FSN chez des patients dialysés ayant une IRM avec ou sans injection d'un CG (Amet et coll., 2012). Cette étude a été effectuée dans 109 centres de dialyse en France et 571 patients ont été inclus. L'étude a été réalisée en 3 étapes, selon la méthodologie présentée dans la **Figure 59**. Vingt-deux patients ont rapporté des lésions cutanées mais, après examen approfondi, aucun de ces cas ne s'est avéré être une FSN. Comme dans l'étude FINEST, la très grande majorité (88,9%) des patients avec injection de CGs ont reçu de l'acide gadotérique. Il est à noter que 6 patients ont reçu du gadodiamide (1 patient) ou de l'acide gadopentétique (5 patients), 2 CGs contre-indiqués chez les patients dialysés.

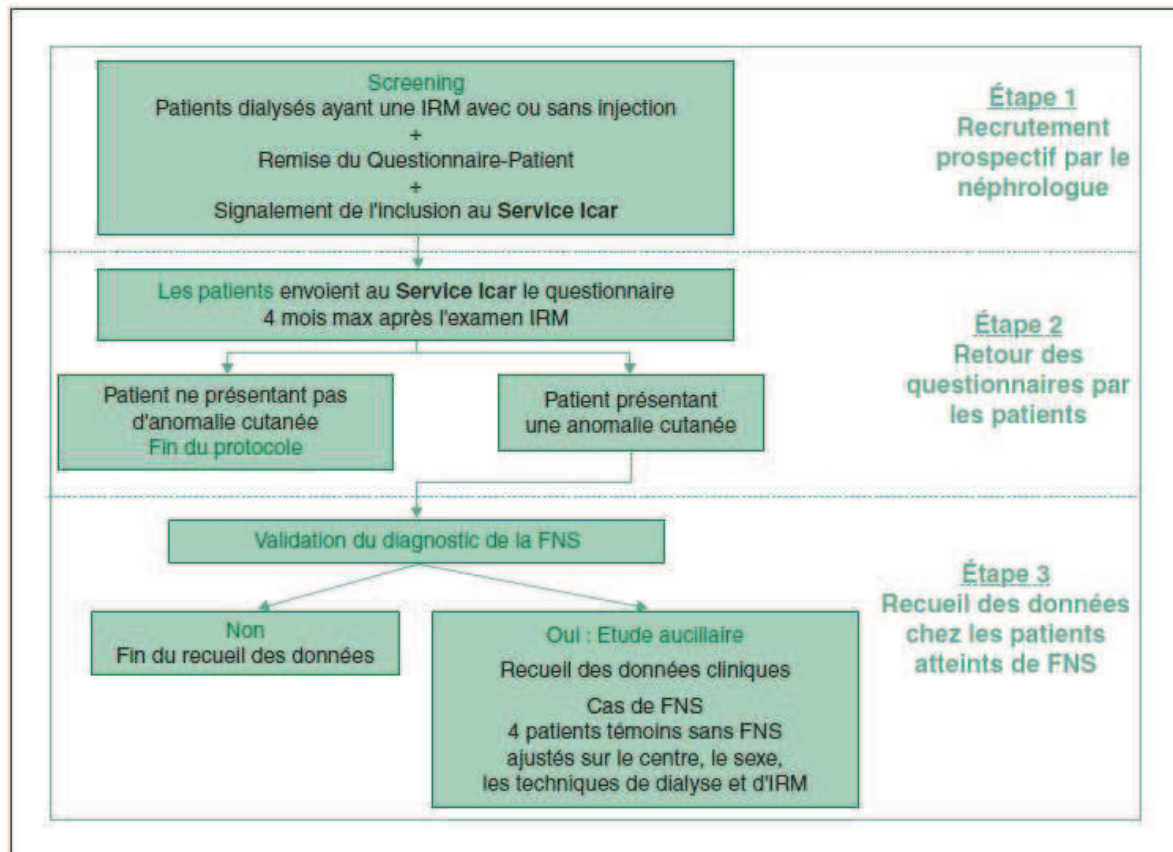


Figure 59 : Méthodologie de l'étude Pro-FINEST (Amet et coll., 2012b)

Il semble que la maladie ait quasiment disparu après la mise en place des mesures de précaution (contre-indication des produits à risque chez l'IRC stade 4 ou 5, doses minimales etc.). En effet, depuis 2010, aucun nouveau cas de FSN n'a été mis en évidence (Penfield et Reilly 2011 ; Wang et coll., 2011 ; Wong, 2012).

3.10 Hypothèses mécanistiques

Le **mécanisme exact de la FSN reste mal connu**. Il est possible de l'étudier en croisant le devenir du CG avec les co-facteurs cliniques connus à ce jour. Cette approche est basée sur la structure des CGs. Nous avons résumé cette approche dans la **Figure 63** ci-dessous.

Dans la littérature, trois hypothèses sont suggérées :

✓ La première hypothèse concerne un effet profibrosant du **complexe de Gd lui-même**, sans faire intervenir sa dissociation. Cette hypothèse est basée sur des études *in vitro* où un effet immédiat a été observé sur des cellules en culture (activation de la voie NFκB par exemple) après ajout de gadodiamide (Wermuth et coll., 2009 et 2012).

✓ La seconde hypothèse suggère un effet de **l'excès de ligand libre**, présent dans la solution pharmaceutique des CGs peu stables (comme le gadodiamide ou l'acide gadopentétique). En effet, ces ligands linéaires pourraient inhiber des métalloenzymes à zinc

(Corot et coll., 1998). Ils pourraient donc, par exemple, inhiber l'activité de certaines MMPs qui présentent une activité collagénolytique, ce qui induirait une accumulation de collagène.

✓ Enfin, la dernière hypothèse citée concerne la possibilité d'une **dissociation du complexe**. Cette hypothèse est la plus couramment citée dans la littérature. Ainsi, du Gd^{3+} dissocié et insoluble a été mis en évidence dans les tissus de patients FSN (Abraham et Thakral 2008 ; Abraham et coll., 2008 ; Boyd et coll., 2007 ; George et coll., 2010 ; High et coll., 2007 ; Sanyal et coll., 2011 ; Swaminathan et coll., 2008 ; Thakral et Abraham, 2009). L'équipe de Frenzel (Frenzel et coll., 2008) a montré la dissociation des CGs linéaires dans du sérum humain à 37°C, alors qu'aucune libération de Gd^{3+} dissocié n'a été observée dans le cas des CGs macrocycliques jusqu'à 15 jours d'incubation (**Figure 60**). L'effet est plus important dans le cas de CGs linéaires non ioniques et il est augmenté en présence d'une concentration de phosphate élevée.

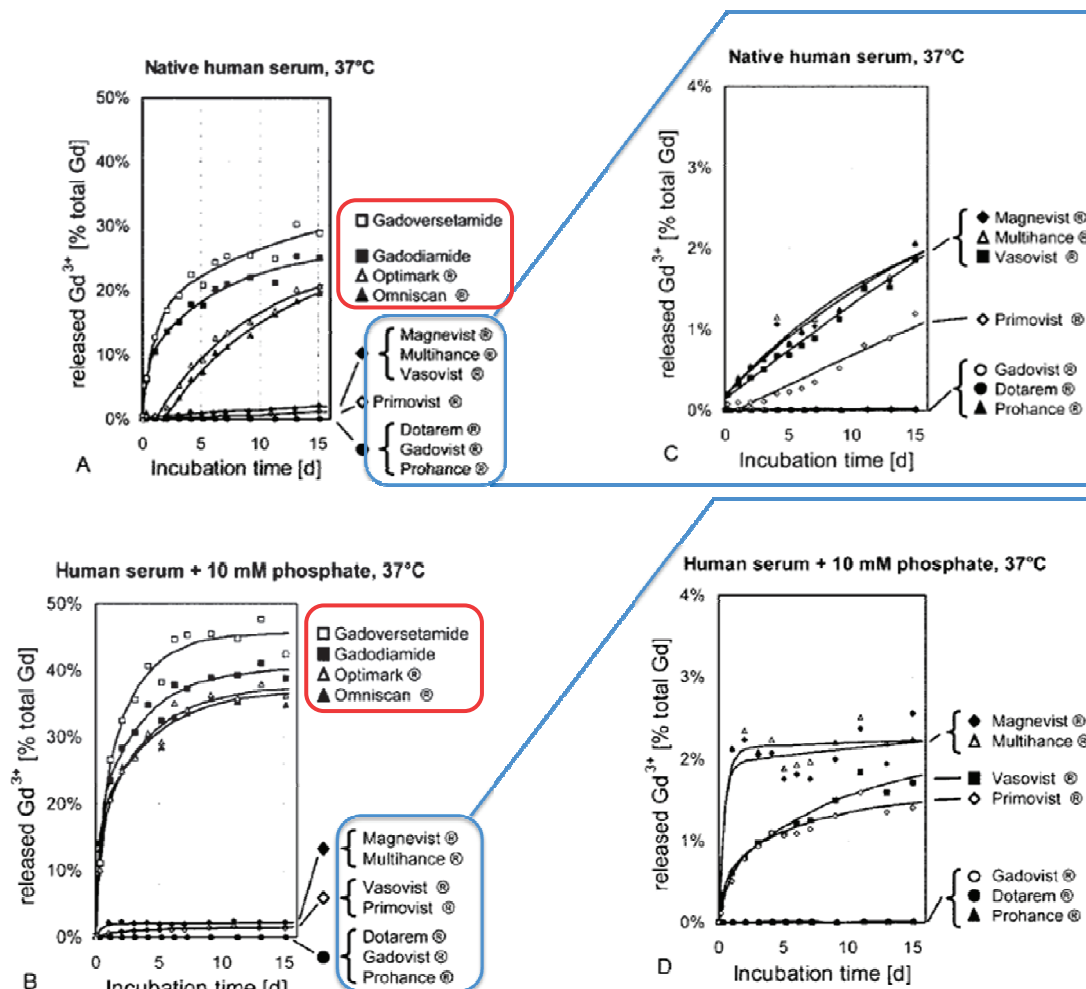


Figure 60 : Libération de Gd^{3+} dissocié (dosage par LC-ICP-MS) après incubation de 1 mM de différents CGs dans du sérum humain à 37°C pendant 15 jours zen présence (B et D) ou non (A et C) de 10 mM de phosphate (Frenzel et coll., 2008).

Le Gd^{3+} pourrait ainsi s'associer à des ions hydroxydes (hydroxyde de Gd, $Gd(OH)_3$), à du carbonate (carbonate de Gd, $Gd_2(CO_3)_3$) ou à du phosphate (phosphate de Gd, $GdPO_4$). Dans

ce cas, le Gd est sous forme précipitée et donc **insoluble**. Les patients FSN présentant fréquemment une hyperphosphatémie, la formation de $GdPO_4$ est envisageable. Le $GdPO_4$, ainsi formé, pourrait être capturé par des macrophages qui libéreraient des cytokines et chimiokines. Ces dernières permettraient, par la suite, d'attirer des fibrocytes circulants CD34 positifs, provenant de la moelle osseuse (Bucala, 2008), qui pourraient s'accumuler au niveau de la peau et par conséquent, produire une quantité importante de collagène (**Figure 61**) (Perazella, 2008). Le Gd insoluble ($GdPO_4$) peut directement activer la prolifération des fibroblastes en culture et libérer progressivement du Gd soluble (Bleavins et coll., 2012).

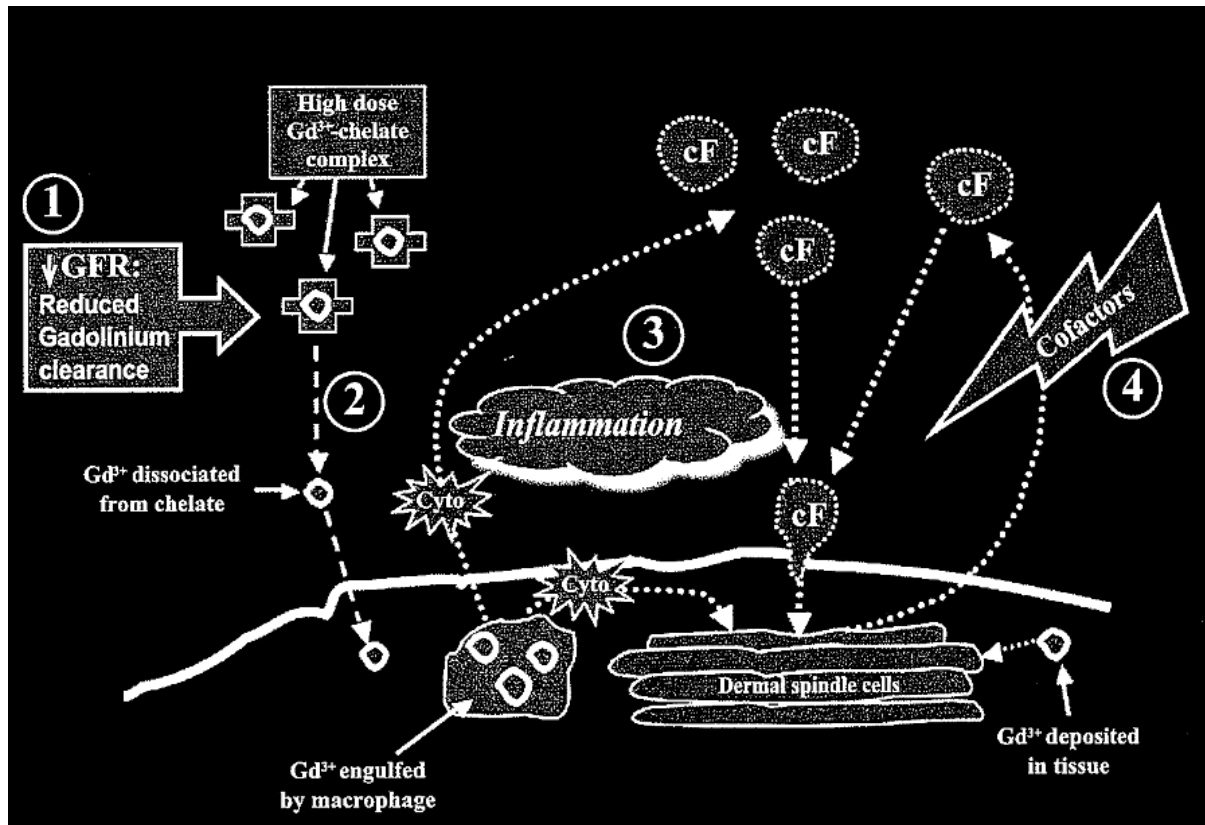


Figure 61 : Mécanisme spéculatif impliquant la capture de gadolinium insoluble par des macrophages puis l'attraction de fibrocytes circulants, en présence de facteurs de risque, dont l'inflammation (Perazella, 2008) (Cyto = cytokines, cF = fibrocytes circulants)

Une autre possibilité concerne la présence de Gd^{3+} sous forme **soluble**. Dans ce cas, le Gd^{3+} dissocié pourrait s'associer à des molécules telles que les peptides ASARM (« Acidic-Serine-Aspartate-Rich-MEPE-associated motif ») (Rowe et coll., 2010), à des glycosaminoglycanes (Taupitz et coll., 2013) ou à des protéines (Evans, 1990). Le Gd^{3+} soluble (chlorure de Gd, $GdCl_3$) peut également stimuler la prolifération de fibroblastes en culture (Bhagavathula et coll., 2010 ; Varani et coll., 2009). Les lanthanides comme le samarium peuvent accélérer la polymérisation du collagène *in vitro* (Drouven et Evans, 1986). Le Gd appartenant à la famille des lanthanides, il pourrait également accélérer la formation des fibres de collagène en se fixant à la partie hélicoïdale de la molécule (**Figure 62**) (hypothèse Stratta et coll., 2008 selon Drouven et Evans, 1986).

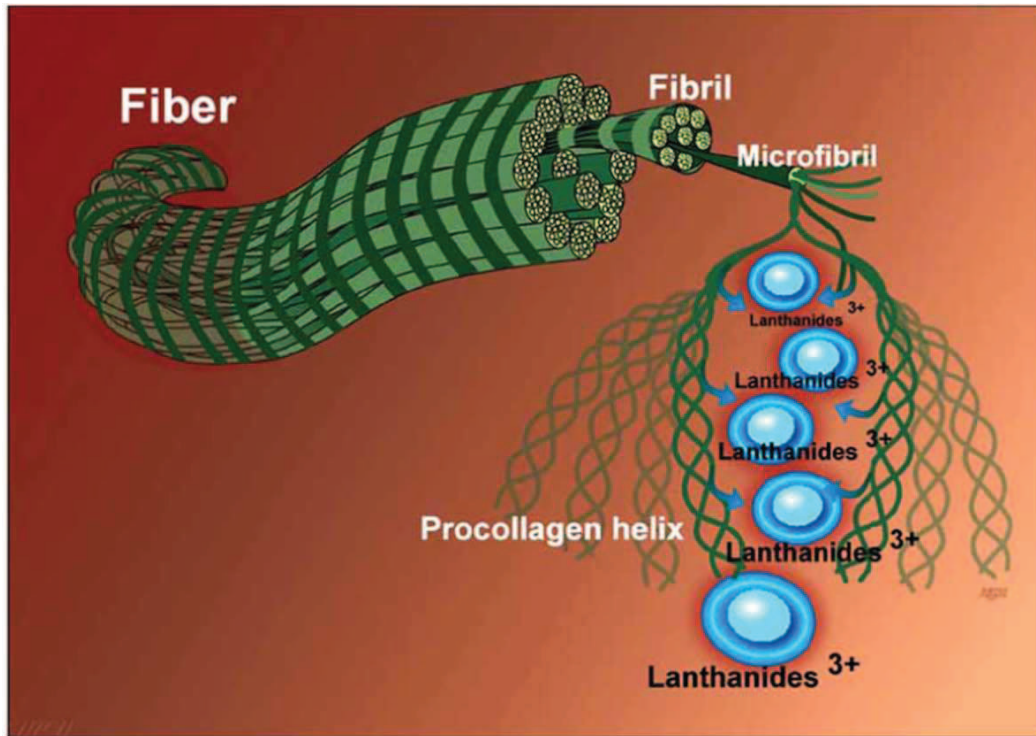


Figure 62 : Fibrillogenèse induite par les lanthanides : fixation des lanthanides à la partie hélicoïdale du collagène (Stratta et coll., 2008)

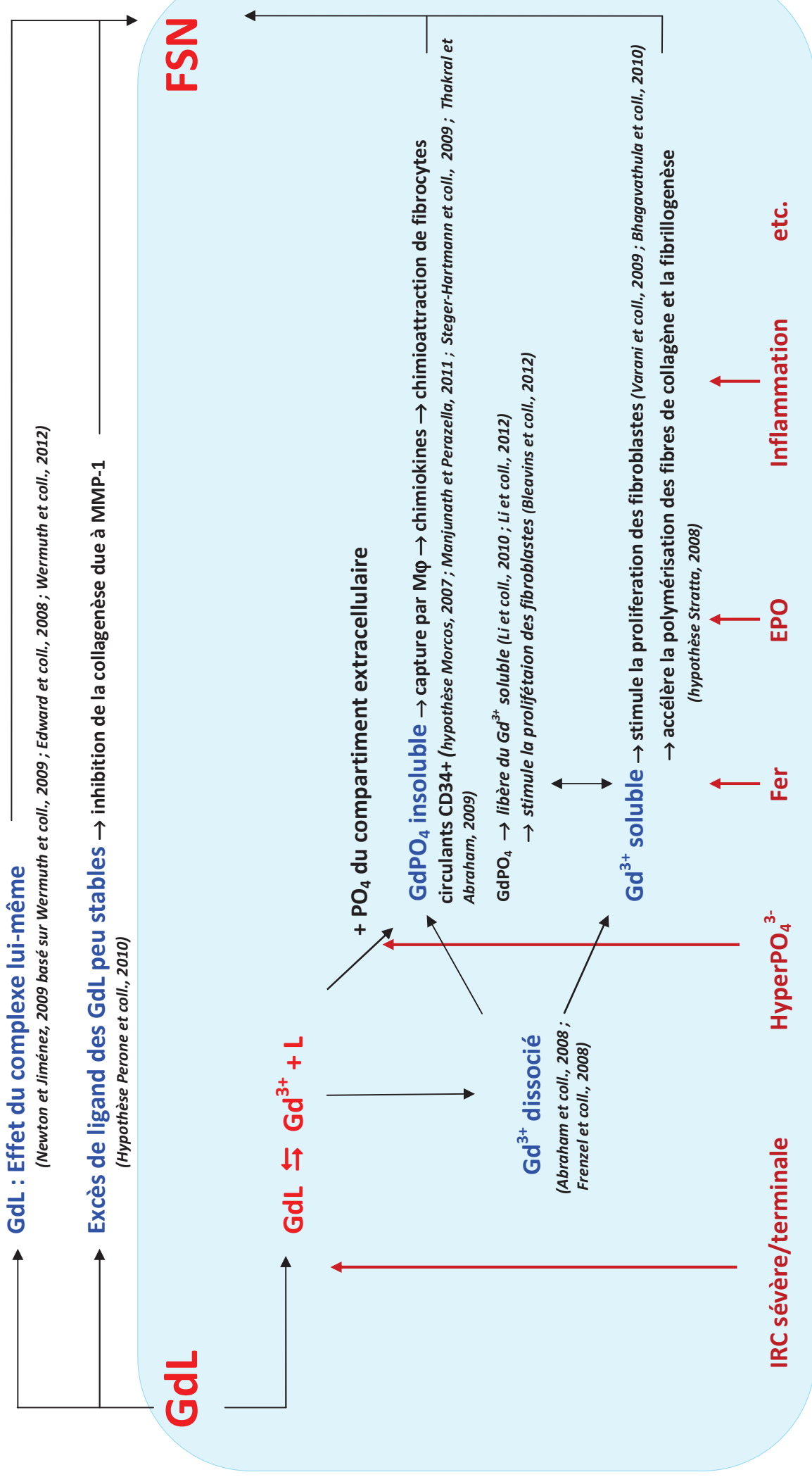


Figure 63 : Représentation schématique des diverses hypothèses mécanistiques du développement de la FSN présentées dans la littérature.

3.11 Modèles précliniques

Il est essentiel de mettre au point un **modèle de FSN *in vivo***, sensibilisé, spécifique et permettant de mieux comprendre le mécanisme de cette pathologie.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la FSN est observée uniquement chez des patients avec une insuffisance rénale, qui induit par conséquent, une augmentation de l'exposition à la molécule. Certaines équipes ont choisi d'injecter de **fortes et de multiples doses de CG** chez des animaux non insuffisants rénaux afin de mimer une exposition prolongée au CG (Sieber et coll., 2008a et 2008b). Pour être plus proche des conditions cliniques, il est essentiel de travailler sur **des rats insuffisants rénaux**, et d'inclure d'autres facteurs associés à la maladie, tels que l'hypersidérémie ou l'hyperphosphatémie, afin de sensibiliser le modèle préclinique mais également pour mieux comprendre leur rôle.

Un modèle préclinique chez le Rat naïf a été proposé par Sieber et coll., (2008a). Il consiste en l'administration répétée de CGs (quotidienne pendant 5 jours par semaine) d'une forte dose de CGs (2,5 mmol/kg/j IV) pendant 4 semaines afin d'induire une rétention du CG chez les animaux. Le CG linéaire non ionique gadodiamide (Omniscan®) a induit des lésions cutanées tardives. Ces lésions ont été plus précoces et plus sévères avec le gadodiamide non formulé (c'est-à-dire du gadodiamide ne comportant pas de ligand « libre », caldiamide, dans sa solution pharmaceutique). Elles ont aussi été fréquentes avec l'EDTA-Gd, un CG de très faible stabilité thermodynamique ($\log K_{\text{cond}} = 14,7$ (Caravan et coll., 1999) (non commercialisé comme agent de contraste), injecté, pour des raisons de tolérance, à une plus faible dose (0,1 mmol/kg IV) et enfin inexistantes avec l'acide gadopentétique, plus stable que le gadodiamide. Une autre étude a montré que les agents macrocycliques sont inactifs sur ce modèle (Sieber et coll., 2008b). Par ailleurs, les concentrations les plus importantes de Gd total ont été retrouvées dans les groupes ayant reçu le gadodiamide non formulé et l'EDTA-Gd, correspondant aux groupes avec les lésions cutanées les plus sévères. Ces données suggèrent un lien entre le Gd^{3+} libéré (et donc la stabilité du CG) et le développement de lésions cutanées.

Dans une étude suivante, la même équipe a montré une augmentation de certaines cytokines dont les chimiokines MCP-1 et -3, les protéines inflammatoires des macrophages MIP-1 β et MIP-2, le facteur nécrosant des tumeurs $\text{TNF}\alpha$, l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases TIMP-1, le facteur de croissance épithélial vasculaire VEGF et l'ostéopontine, 6 heures après l'administration unique de gadodiamide chez le Rat naïf (Steger-Hartmann et coll., 2009).

La même équipe s'est ensuite intéressée au Rat néphrectomisé (des 5/6^e) (Pietsch et coll., 2009a). Le nombre d'injections des CGs a, logiquement, été réduit à 5 injections consécutives au lieu des 20 injections effectuées chez le Rat naïf. Cette étude avec injection de CGs (5 x 2,5 mmol/kg/j IV à partir de 3 semaines après la dernière néphrectomie) a présenté des lésions cutanées avec le gadodiamide formulé pour seulement 3 rats sur 12, à

partir de 5 jours après la dernière injection. Fait intéressant, les lésions cutanées ont été observées chez les animaux présentant la concentration de gadolinium la plus élevée dans la peau.

La pertinence du modèle d'administration répétée chez le Rat a été discutée dans une étude comparative entre des rats naïfs et néphrectomisés des 5/6^e recevant une forte dose (5 mmol/kg/j IV, 13 administrations quotidiennes) de gadodiamide formulé ou non (Grant et coll., 2009). Les auteurs ont suggéré que les lésions de peau observées chez les animaux recevant le gadodiamide sont dues au grattage des animaux et que les lésions histologiques ne sont causées par une libération d'histamine.

Par ailleurs, une étude réalisée chez le Rat naïf ou néphrectomisé des 5/6^e montre une augmentation de la cellularité et de la concentration de gadolinium total dans la peau, après une injection unique de gadodiamide à une dose de 2,5 mmol/kg (Haylor et coll., 2010). Par la suite, cette même équipe (Haylor et coll., 2012) a comparé 2 CGs, l'acide gadotérique et le gadodiamide, chez le Rat néphrectomisé des 5/6^e, selon le protocole d'administration de Pietsch et coll., (2009). Les rats ayant reçu le gadodiamide présentent une rétention du Gd total nettement supérieure à celle mesurée avec l'acide gadotérique (concentration de Gd total 40 fois supérieure dans la peau et 14 fois supérieure dans l'os). Une hypercellularité du derme a également été notée chez ces animaux. Enfin, des dépôts intracellulaires de Gd (dans les fibroblastes) et dans le milieu extracellulaire (autour des fibres de collagène) ont été observés chez les rats ayant reçu du gadodiamide alors qu'ils étaient absents chez les rats ayant reçu de l'acide gadotérique.

Le rôle du fer et de l'EPO, deux facteurs associés à la FSN (Marckmann, 2007), a été étudié chez le Rat (Hope et coll., 2009). L'administration concomitante d'**EPO et de fer dextran sensibilise** des animaux naïfs aux effets profibrosants du gadodiamide. Le mécanisme de cet effet sensibilisant n'est pas connu.

Chapitre 4 : OBJECTIFS DE LA THESE

A l'heure actuelle, la physiopathologie et le mécanisme de la fibrose systémique néphrogénique sont encore mal connus. Différentes hypothèses ont été proposées (comme celle d'une dissociation des CGs les moins stables) mais sans démonstration formelle. De plus, il n'existe aucun traitement reconnu de la FSN ou de d'autres fibroses comme la sclérose systémique, une maladie qui a de nombreuses similitudes avec la FSN.

Une meilleure compréhension des facteurs associés à la maladie ou des voies de signalisation impliquées pourrait permettre de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques qui permettraient de limiter l'évolution de la FSN.

Il nous a également semblé essentiel de mieux comprendre le rôle des complexes de gadolinium dans le développement de la FSN.

Pour cela, nous avons, dans un premier temps, étudié la dissociation des complexes de gadolinium, tant *in vitro* dans du sérum, qu'*in vivo*, chez le Rat insuffisant rénal.

Nous avons également souhaité mettre au point différents modèles de FSN chez le Rat afin de pouvoir comparer les différentes catégories de CGs commercialisés. Nous souhaitons obtenir un modèle discriminant et cliniquement pertinent qui intègre des facteurs associés (comme l'hyperphosphatémie).

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'implication la voie de signalisation du TGF β , un marqueur clé et central de la fibrose, dans les effets du gadodiamide sur les modèles que nous avons mis au point.

PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre 5 : DISSOCIATION DES COMPLEXES DE GADOLINIUM

5.1 Dissociation *in vitro* des complexes de gadolinium

5.1.1 Introduction

La **dissociation** des complexes de gadolinium est l'hypothèse de mécanisme de la FSN la plus largement citée dans la littérature. Des dépôts de Gd insolubles, parfois associés à du phosphate, ont été retrouvés dans des biopsies de peau ou d'autres organes de patients souffrant de FSN (Abraham et Thakral 2008 ; Abraham et coll., 2008 ; Boyd et coll., 2007 ; George et coll., 2010 ; High et coll., 2007 ; Sanyal et coll., 2011 ; Swaminathan et coll., 2008 ; Thakral et Abraham, 2009). La **dissociation *in vitro*** progressive des CGs linéaires dans du **sérum humain** à 37°C a été montrée (par CLHP, chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif : CLHP/SM) alors qu'aucune libération de Gd^{3+} dissocié et « libre » n'a été observée en présence de CGs macrocycliques jusqu'à 15 jours d'incubation (Frenzel et coll., 2008). Cette dissociation est plus importante dans le cas de CGs linéaires non ioniques. Par ailleurs, une augmentation de la concentration sérique de phosphate (concentration ajustée à 10 mM de phosphate) accélère la libération de Gd^{3+} « libre ». Cependant, cette hypothèse de dissociation est **controversée** (Newton et Jimenez, 2009). Par conséquent, il nous est apparu nécessaire d'étudier la dissociation éventuelle des CGs, dans la mesure où ce phénomène peut directement conditionner le mécanisme de la maladie.

Pour cela, nous avons étudié la dissociation des CG *in vitro* dans un milieu biologique, par une méthode indirecte, la **relaxométrie**.

Le principe de cette approche est basé sur le postulat suivant : la relaxométrie, couplée à une méthode de dosage élémentaire (spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif), permet de déterminer la forme moléculaire du gadolinium. En effet, selon la forme moléculaire, complexée (GdL) ou décomplexée (Gd^{3+} soluble ou $GdPO_4$ insoluble), les constantes de relaxivité r_1 sont différentes (Caravan, 1999 ; Laurent et coll., 2006 ; Port et coll., 2008 ; Rohrer et coll., 2005) :

- r_1 (forme complexée GdL) ≈ 3 à $4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.
- r_1 (Gd^{3+} libre et soluble) $\approx 12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Le Gd libéré est alors sous forme soluble et la relaxivité augmente car le Gd^{3+} libre possède 9 sites de coordinations avec les protons.
- r_1 ($GdPO_4$ libre et insoluble) $\approx 0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Le Gd libéré précipite sous forme de $GdPO_4$ et ne participe donc plus à la relaxivité globale observée.

Donc, nous posons l'hypothèse qu'une modification significative de la constante de relaxivité r_1 par rapport à celle du CG étudié correspond à une modification de la forme sous laquelle se trouve le métal gadolinium dans le tissu étudié. Une augmentation de la valeur de r_1

signifie la présence de gadolinium libre et soluble alors qu'une diminution de cette valeur signifie la présence de gadolinium libre mais précipité.

La mesure de la **vitesse de relaxation R_1** (inverse du temps de relaxation T_1 mesuré au relaxomètre à 60 MHz) est une approche très sensible de la stabilité d'un CG. Elle permet des mesures répétées sur un même échantillon de sérum ou de plasma, à 37°C et donc le suivi temporel de la **stabilité** du CG.

Il nous a donc paru pertinent de procéder à la comparaison des effets de divers CGs (en commençant par le gadodiamide) sur le R_1 dans le milieu biologique complexe qu'est le **sérum** de Rat puis humain, **ajusté ou non à 10 mM de phosphate**. Enfin, la mesure du R_1 diamagnétique (sérum sans CG) a été réalisée dans la même période, afin de vérifier la stabilité du milieu à 37°C.

5.1.2 Matériel et méthodes

• Préparation des solutions

Les solutions à 1,0 mM de Gd (produits de contraste [Tableau 29] ou acétate de Gd [sel soluble de Gd]) sont préparées dans un pool de sérum ou plasma de différents rats, dans du séronorm reconstitué ou du sérum humain (Tableau 30).

Tableau 29 : Produits utilisés

Produit	Nom commercial	Provenance	Lot	Concentration de Gd (mM)
gadodiamide	Omniscan [®]	GE Healthcare	10942539 11318626	500
acide gadopentétique	Magnevist [®]	Bayer	92083K	500
acide gadotérique	Dotarem [®]	Guerbet	09GD022A 10GD054A	500
gadobutrol	Gadovist [®]	Bayer	94033A	1000
Acétate de Gd	-	Synthèse Guerbet	-	154

Tableau 30 : Matrices utilisées

Matrices	Provenance	Lot
Plasma de Rat (prélevé sur héparine 15 UI/mL)	Rats témoins (Guerbet)	-
Sérum de Rat	Rats témoins (Guerbet)	-
Séronorm (sérum humain lyophilisé et reconstitué)	InGen BioSciences	0906238 1109514
Sérum humain	Etablissement Français du Sang	29999

Une solution mère de tampon phosphate (100 mM) est préparée à partir d'un sachet de PBS (« phosphate buffered saline », SIGMA, P5368), et 100 mL d'eau milliQ.

Afin d'ajuster le sérum à 10 mM de phosphate, la concentration sérique de phosphate est mesurée (Vitros DT60, OrthoClinical Diagnostics). Du tampon phosphate à 100 mM est ensuite ajouté afin d'obtenir une concentration de phosphate à 10 mM. Cette valeur est par la suite vérifiée (Vitros DT60, OrthoClinical Diagnostics).

Les échantillons sont préparés à T0 et sont immédiatement placés à 37°C dans une étuve. Le suivi du R_1 est réalisé jusqu'à 24 h, 48 h ou 15 jours.

NB : Lors des études effectuées pendant 15 jours, nous avons ajouté 0,01% d'azide de sodium à nos solutions afin d'éviter une contamination microbiologique.

- **Mesure du temps de relaxation longitudinal T_1 au relaxomètre**

Les temps de relaxation T_1 ont été mesurés au relaxomètre Minispec® (Bruker) à 60MHz (soit un champ magnétique de 1,42 Tesla), à 37°C, avec des séquences inversion/récupération (voir **annexe 1** pour plus de précisions).

- **Dosage du gadolinium total dans le plasma**

Le dosage de gadolinium total a été réalisé par spectrométrie de masse (effectué par le service de Bioanalyse, Laboratoire Guerbet). Cette technique ne permet pas de distinguer le Gd^{3+} « libre » du gadolinium complexé sous forme d'agent de contraste.

Les échantillons de plasma sont tout d'abord minéralisés dans l'acide nitrique (HNO_3 65%) pendant 8 heures à 80°C. L'échantillon est ensuite analysé par spectrométrie de masse. La concentration est exprimée en $\mu\text{mol/L}$ de minéralisat. Cette concentration lue est corrigée de la masse de minéralisation sur la masse de l'échantillon et du facteur de dilution sur la densité, pour obtenir une concentration de gadolinium exprimée en $\mu\text{mol/L}$ de plasma. La limite de détection est de 0,03 $\mu\text{g/L}$ et la limite de quantification est de 0,1 $\mu\text{g/L}$.

5.1.3 Résultats

5.1.3.1 Suivi du R_1 des CGs dans plasma de Rat à 37°C, mesurée par relaxométrie

Une augmentation progressive de la valeur de R_1 au cours du temps a été observée avec le CG linéaire et non ionique, gadodiamide, dans du plasma de Rat (concentration de phosphate plasmatique à 2,4 mM) alors que pour les CG macrocycliques (acide gadotérique et gadobutrol), la valeur de R_1 est restée stable jusqu'à la fin de l'étude, soit 48 heures (**Figure 64**). Pour le gadodiamide, cette augmentation de la valeur de R_1 a été observée précocement, dès la 1^{ère} heure d'incubation.

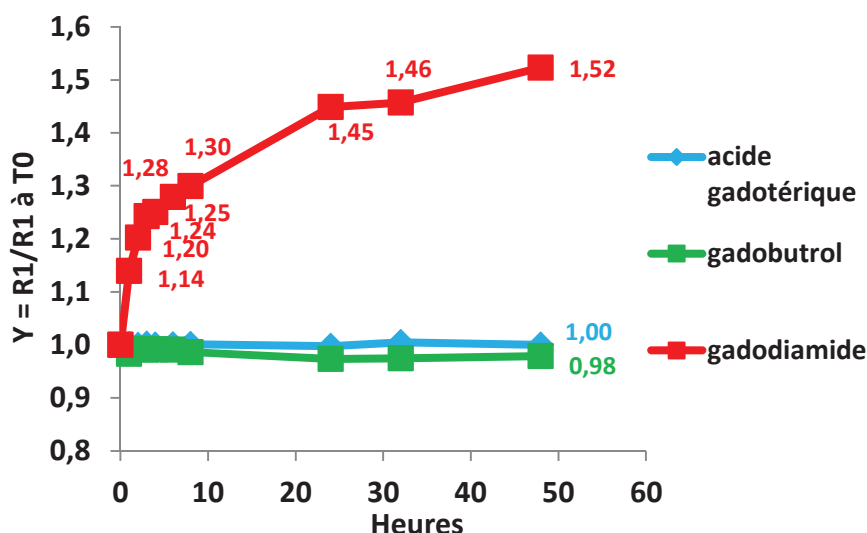


Figure 64 : Evolution temporelle du rapport entre la valeur de R_1 par rapport à celle mesurée à T_0 , pour 3 différents CGs dans du plasma de Rat, par relaxométrie (60 MHz) pendant 48 heures

Dans un deuxième temps, nous avons ajusté la concentration plasmatique de phosphate à 10 mM (vs. 1,7 mM dans le pool de plasma de Rat utilisé). L'augmentation de la valeur de R_1 est accélérée et d'amplitude plus importante en présence de 10 mM de phosphate par rapport à celle mesurée dans du plasma de Rat normal.

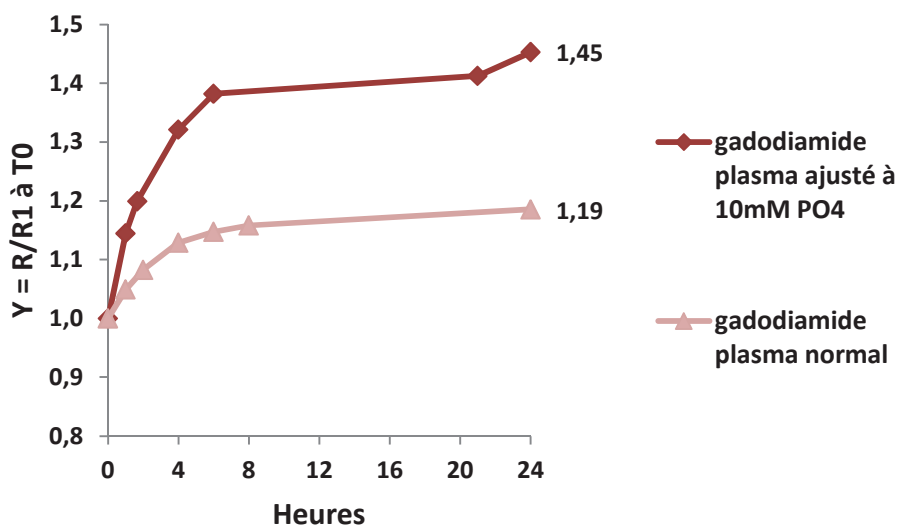


Figure 65 : Evolution temporelle du rapport entre la valeur de R_1 par rapport à celle mesurée à T_0 du gadodiamide dans du plasma de Rat ajusté ou non à 10 mM de phosphate, par relaxométrie (60 MHz) pendant 24 heures

5.1.3.2 Plasma de Rat versus sérum de Rat

Nous avons ensuite comparé les valeurs de R_1 obtenues dans du plasma (concentration de PO_4 à 1,7 mM) à celles mesurées dans du sérum (concentration de PO_4 de 1,8 mM) issu des mêmes rats. Les concentrations de PO_4 du plasma et du sérum étaient ajustées ou non à 10 mM.

Aux deux concentrations de PO_4 , aucune différence dans l'évolution temporelle de la valeur de R_1 n'a été observée entre du plasma et du sérum de Rat (**Figure 66**).

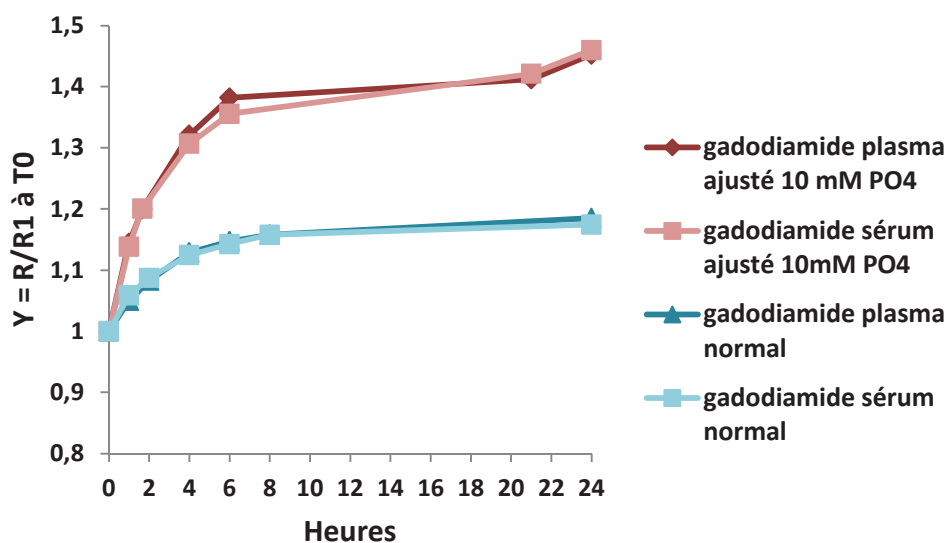


Figure 66 : Evolution temporelle du rapport entre la valeur de R_1 par rapport à celle mesurée à T_0 du gadodiamide dans du plasma ou du sérum de Rat ajusté ou non à 10 mM de phosphate, par relaxométrie (60 MHz) pendant 24 heures

5.1.3.3 Suivi du R_1 dans le séronorm à 37°C, mesurée par relaxométrie

La stabilité de trois catégories de CGs et d'un sel soluble de Gd (acétate de Gd) ont été étudiée en comparant l'évolution de la valeur de R_1 à 37°C dans du séronorm (sérum humain reconstitué ; concentration de PO_4 à 1,08 mM) avec une concentration de phosphate normale ou ajustée à 10 mM pendant 15 jours (pour permettre une comparaison avec les résultats décrits par Frenzel et coll., 2008, par la méthode CLHP/SM).

La valeur de R_1 est restée stable pendant 15 jours avec tous les CGs testés dans du séronorm à une concentration de phosphate physiologique (**Figure 67**). En revanche, pour le CG linéaire et non ionique, le gadodiamide, la valeur de R_1 a augmenté progressivement au cours du temps, en présence de séronorm ajusté à 10 mM de phosphate, alors que celle des deux autres CGs étudiés (acide gadotérique et acide gadopentétique) est restée stable.

En ce qui concerne l'acétate de Gd, la valeur de R_1 a diminué au cours du temps en présence de séronorm (-16%). L'effet est accéléré et d'amplitude plus importante en présence d'une concentration élevée de phosphate (-52%) (**Figure 67**).

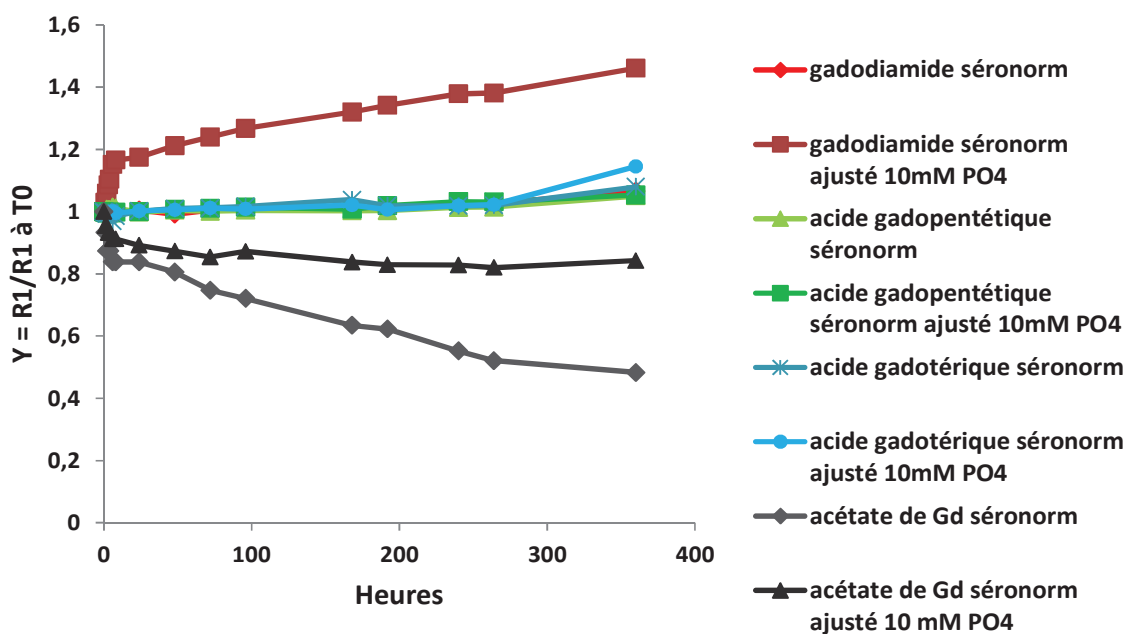


Figure 67 : Evolution temporelle du rapport entre la valeur de R_1 par rapport à celle mesurée à T_0 de différents CGs et de l'acétate de Gd dans du séronorm ajusté ou non à 10 mM de phosphate, par relaxométrie (60 MHz) pendant 360 heures

5.1.3.4 Ajustement des concentrations de cations et de phosphate du séronorm à celles mesurées dans le sérum de Rat

Nous avons comparé les concentrations sériques de différents analytes entre le séronorm et le sérum de Rat (Rats Wistar et SD) (**Tableau 31**). Les concentrations de certains de ces analytes sont plus élevées chez l'Homme que chez le Rat et les concentrations d'autres (comme le phosphate, le zinc, le calcium et le fer) sont inférieures. Nous avons donc choisi d'ajuster la concentration sérique de chacun de ces 4 marqueurs mesurés dans le séronorm à celle mesurée dans le sérum de Rat, un à un dans un premier temps, puis en association. La valeur de R_1 a été suivie pendant 24 heures à 37°C.

Tableau 31 : Comparaison des concentrations sériques de différents analytes entre le séronorm et sérum de Rat (Rats Wistar et SD) (↔ : concentrations équivalentes, ↘ : concentration de l'analyte légèrement inférieure chez l'Homme, ↓ : concentration plus faible chez l'Homme, ↑ ; concentration plus importante chez l'Homme, ↑↑ : concentrations très augmentée chez l'Homme vs. celle du Rat) (N/D : non déterminé)

Marqueurs sériques	Unité	Séronorm	Sérum Rat (Wistar - Janvier)	Sérum Rat (SD)	Différence Homme vs. Rat
Na ⁺	mM	136	143,6	141,8	↔
K ⁺	mM	3,73	3,8	4,39	↔
Cl ⁻	mM	103	103,9	104,5	↔
Ca ²⁺	mM	2,19	2,731	2,7	↘
Phosphore	mM	1,02	2,489	2,95	↓
Fer	μM	21,8	N/D	35,6	↓
Zinc	μM	9,6	N/D	18,2	↓
Cuivre	μM	16,4	N/D	18	↔
Glucose	mM	4,39	6,926	7,47	↓
Urée	mM	4,9	4,806	4,1	↔
Créatinine	μM	76	26,3	42	↑
Bilirubine totale	μM	14,8	1,36	2	↑↑
Protéines	g/L	72,1	64,3	62	↗
Albumine	g/L	45	42,6	32	↔
Cholestérol	mM	3,56	1,822	1,4	↑
Triglycérides	mM	1,32	0,969	0,4	↑

Nous n'avons observé aucune variation de la valeur de R_1 au cours du temps, quel que soit le marqueur sérique ajusté, un à un puis tous ensemble.

5.1.3.5 Suivi du R_1 dans le sérum humain comparé au séronorm pendant 15 jours et à 37°C, par relaxométrie

Les résultats observés dans le séronorm sont comparables à ceux observés dans notre étude précédente. Aucune modification de la valeur de R_1 n'a été observée dans le séronorm alors qu'une augmentation progressive du R_1 a été observée en présence d'une concentration plus importante de phosphate (10 mM). Cependant, à 15 jours, une petite augmentation de la valeur de R_1 a été observée. Toutefois, une évaporation concomitante de ce tube a également été notée, ce qui pourrait expliquer une augmentation de la concentration de gadolinium dans l'échantillon et par conséquent une augmentation de la valeur de R_1 .

En revanche, dans du sérum humain, nous avons observé une augmentation progressive de la valeur de R_1 à partir de 8 heures. Elle est comparable à celle observée dans du séronorm ajusté à 10 mM de phosphate. L'ajout de phosphate au sérum humain a accéléré l'augmentation de la valeur de R_1 (**Figure 68**).

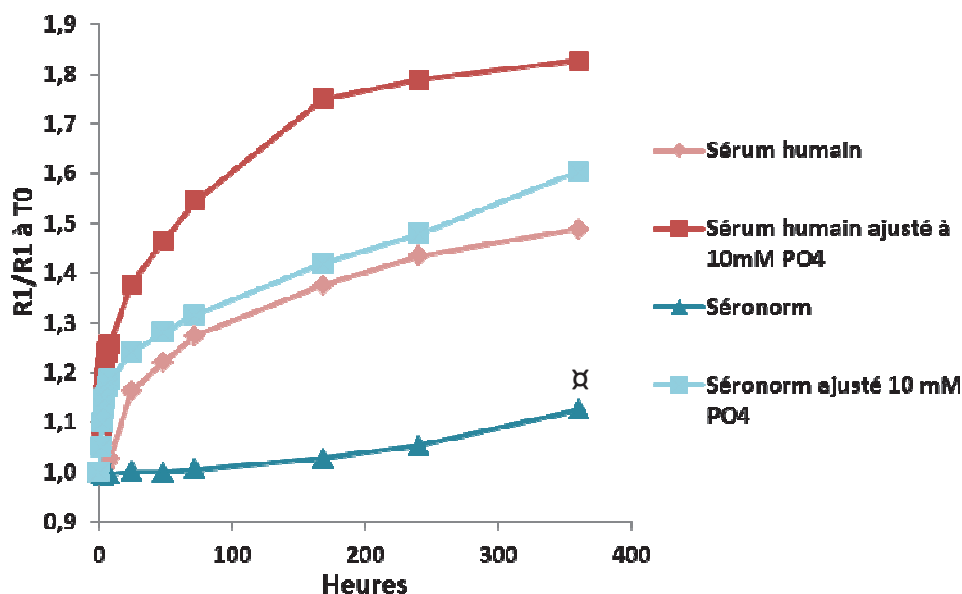


Figure 68 : Evolution temporelle du rapport entre la valeur de R_1 par rapport à celle mesurée à T0 du gadodiamide dans du sérum humain ou séronorm ajustés ou non à 10 mM de phosphate, par relaxométrie (60 MHz) pendant 360 heures (x : observation d'une évaporation de l'échantillon)

5.1.3.6 Ultracentrifugation du plasma de Rat

La stabilité du gadodiamide et de l'acétate de Gd a été évaluée par la mesure de la valeur de R_1 dans du plasma de Rat et du plasma de Rat préalablement ultracentrifugé afin de supprimer les protéines de l'échantillon.

Après ultracentrifugation (30 min, 1811G), le plasma de Rat est dépourvu de protéines (Tableau 32).

Paramètres	Avant ultracentrifugation	Après ultracentrifugation
Phosphatase alcaline (U/L)	206	22
Phosphore (mmol/L)	1,97	1,74
Calcium (mmol/L)	2,71	1,54
Albumine (g/L)	39	<1
Bilirubine totale ($\mu\text{mol/L}$)	<1	1
Protéines totales (g/L)	63	<20

Tableau 32 : Concentration plasmatique de différents paramètres plasmatiques avant et après ultracentrifugation

Après ultracentrifugation et incubation avec du gadodiamide, la valeur de R_1 a diminué lentement et progressivement, contrairement à ce qui est observé dans du plasma de Rat normal, où l'on note une augmentation importante et progressive du R_1 (Figure 69).

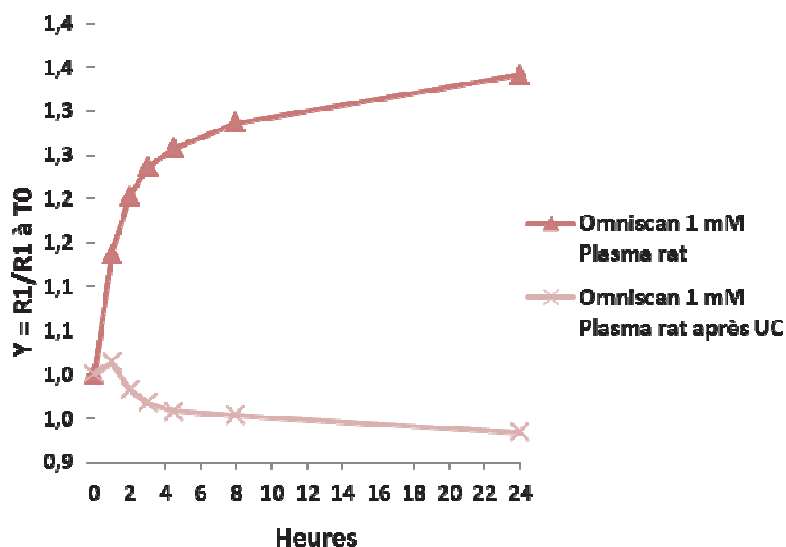


Figure 69 : Evolution temporelle du rapport entre la valeur de R_1 par rapport à celle mesurée à T_0 de gadodiamide dans du plasma de Rat après ultracentrifugation ou non, par relaxométrie (60 MHz) pendant 24 heures

Après incubation de l'acétate de Gd dans du **plasma sans protéines**, la diminution du R_1 est accentuée (Figure 70). Un précipité a été observé instantanément.

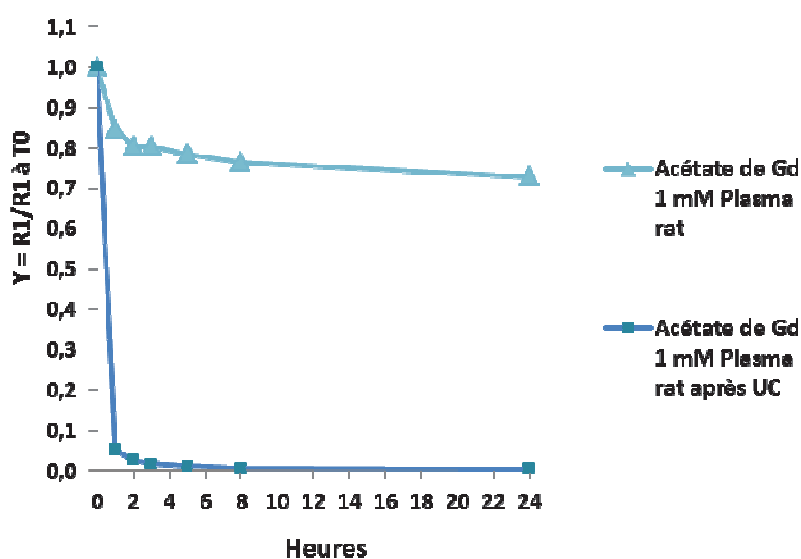


Figure 70 : Evolution temporelle du rapport entre la valeur de R_1 par rapport à celle mesurée à T_0 de l'acétate de Gd dans du plasma de Rat après ultracentrifugation ou non, par relaxométrie (60 MHz) pendant 24 heures

5.1.4 Conclusion

Nos résultats montrent une **augmentation progressive de la valeur de R_1** au cours du temps quand le CG linéaire et non ionique, **gadodiamide** était placé dans du plasma ou sérum de Rat et du sérum humain. Au contraire, les **CGs macrocycliques** (acide gadotérique et

gadobutrol) sont restés **stables**. Cette augmentation de la valeur de R_1 suggère une **dissociation progressive du gadodiamide**, avec libération de **Gd³⁺ dissocié** et sous forme **soluble**. Nos données suggèrent également que le Gd³⁺ dissocié du complexe gadodiamide **se fixe aux protéines**. En effet, en l'absence de protéines (après ultracentrifugation du plasma), nous n'observons plus d'augmentation de la valeur de R_1 . Au contraire, nous observons une petite diminution lente de cette valeur, pour laquelle nous n'avons pas d'explication.

Néanmoins, cette augmentation de la valeur de R_1 pour le gadodiamide n'a **pas été retrouvée** dans le **séronorm**, un pool de sérum humain lyophilisé puis reconstitué. L'ajout de phosphate et de différents cations aux concentrations physiologiques observées dans le sérum de Rat n'ont pas permis la dissociation du gadodiamide dans le séronorm.

Dans toutes les matrices étudiées, **l'ajout d'une concentration élevée de phosphate a accéléré** l'augmentation de la valeur de R_1 et donc la **dissociation du gadodiamide *in vitro*** dans un milieu biologique et à température physiologique. Au contraire, l'ajout de phosphate n'a eu aucun effet dans le cas d'un CG linéaire et ionique, l'acide gadopentétique, et d'un CG macrocyclique et ionique, l'acide gadotérique.

Ces différents résultats seront discutés et confrontés à la littérature dans le chapitre « Discussion générale » de la thèse.

5.2 Dissociation *in vivo* des complexes de gadolinium (Article 1)

5.2.1 Rationnelle

Nous avons préalablement montré que le gadodiamide, un CG linéaire et non ionique se dissocie progressivement dans du sérum de Rat et humain, avec libération progressive de Gd^{3+} dissocié et soluble, contrairement aux CGs macrocycliques qui restent stables au cours du temps.

Dans un deuxième temps, nous avons choisi d'étudier la **dissociation de ces CGs *in vivo*** sur un modèle d'insuffisance rénale chez le Rat. En effet, pour être proche des conditions cliniques, il nous a semblé essentiel de travailler sur des rats insuffisants rénaux. Chez l'Animal, la dissociation des CGs linéaires a été suggérée (Pietsch et coll., 2009a ; Pietsch et coll., 2011a ; Sieber et coll., 2008a ; 2008b ; Steger-Hartmann et coll., 2009) mais aucune étude n'a formellement démontré la présence de Gd^{3+} dissocié *in vivo* car les méthodes analytiques utilisées ne le permettent pas. En effet, les techniques de spectrométrie (spectrométrie d'émission atomique à plasma inductif ou spectrométrie de masse à plasma inductif) nécessitent la minéralisation préalable des échantillons par l'acide nitrique. L'acidité de l'échantillon conduit à la dissociation des CGs.

Nous avons choisi d'utiliser le modèle d'insuffisance rénale induite par **néphrectomie des 5/6^e** chez le Rat. Ce modèle est classiquement utilisé dans la littérature (Grant et coll., 2009 ; Haylor et coll., 2010 ; Pietsch et coll., 2009a). **Deux catégories moléculaires de CGs** ont été testées : un CG macrocycle et ionique, l'acide gadotérique (Dotarem[®]) (stabilités cinétique et thermodynamique élevées), et un CG linéaire et non ionique, le gadodiamide (Omniscan[®]) (faibles stabilités cinétique et thermodynamique). Le gadodiamide non formulé (c'est-à-dire, le gadodiamide sans l'excès de ligand présent dans la solution pharmaceutique) a également été étudié.

Le protocole d'administration des CGs utilisé est celui décrit par Pietsch et coll. 2009 (c'est à dire 5 injections intraveineuses, à raison d'une fois par jour pendant 5 jours consécutifs, à la dose de 2,5 mmol/kg). La répétition des administrations se justifie par notre volonté de nous comparer à la littérature. Par ailleurs, une étude clinique a montré que la dose cumulée de CG est un facteur de risque de survenue de FSN, contrairement à la dose unitaire (Collidge et coll., 2007).

La dose unitaire choisie (2,5 mmol/kg) est considérablement plus élevée que la dose clinique (au maximum 0,3 mmol/kg pour une angiographie par IRM). En fait, il convient de corriger ces doses par la surface corporelle. La FDA recommande de multiplier par 6,2 la dose humaine afin d'obtenir un équivalent pertinent chez le Rat (FDA, 2005). Sur la base de ce rapport, la dose utilisée dans notre étude équivaut à la dose de 0,4 mmol/kg chez l'Homme. La pharmacocinétique doit aussi être prise en compte. En effet, le Rat présente un débit de filtration glomérulaire par unité de masse corporelle supérieur à celui de l'Homme (8 vs.

1,5 mL/mn/kg) (Fleck, 1999). La demi-vie d'élimination d'un CG chez le Rat (20 mn) (Oksendal et Hals, 1993) est par conséquent plus courte que chez l'Homme (90 mn) (Chachuat et coll., 1992), ce qui réduit la durée d'exposition des tissus à la molécule. Dans le cas d'une insuffisance rénale, ces délais d'excrétion sont bien entendu prolongés, mais dans un rapport similaire entre Rat et Homme (Sieber et coll., 2008b).

Afin d'étudier la dissociation des CGs *in vivo*, nous avons choisi **deux techniques** distinctes et complémentaires : le **dosage de Gd³⁺ « libre » dans le plasma** au sacrifice, CLHP/SM (selon la méthode décrite par Frenzel et coll., 2008) et l'étude de la **relaxivité** dans les tissus solides (méthode indirecte) par **relaxométrie**.

En effet, il est possible de comparer la valeur de la constante de relaxivité r_1 obtenue *in vivo* (mesure du temps de relaxation T_1 par relaxométrie à 60 MHz, et ramené à la concentration de Gd totale présente dans l'échantillon, mesurée par spectrométrie de masse) à la valeur de référence déterminée *in vitro* (intervalle de référence : $r_1 \text{ in vitro} \pm 23\%$, incertitude déterminée lors d'études préalables) en surchargeant le CG dans la matrice tissulaire (os et peau). Ainsi, il est possible d'estimer la forme sous laquelle se trouve le CG : complexée (si la valeur de $r_1 \text{ in vivo}$ est équivalent au $r_1 \text{ in vitro}$), dissociée et soluble (si la valeur de $r_1 \text{ in vivo}$ supérieur au $r_1 \text{ in vitro}$) ou dissociée et insoluble (si la valeur de $r_1 \text{ in vivo} < r_1 \text{ in vitro}$). La rétention tissulaire de Gd total a également été étudiée par spectrométrie de masse.

Enfin, une analyse histologique et immunohistochimique de la peau a été effectuée.

Ces travaux ont donné lieu à la publication suivante (article 1) :

Fretellier N, Idée JM, Dencausse A, Karroum O, Guerret S, Poveda N, Jestin G, Factor C, Raynal I, Zamia P, Port M, Corot C. Comparative in vivo dissociation of gadolinium chelates in renally impaired rats: a relaxometry study. *Invest Radiol.* 2011b; 46: 292-300.

Comparative In Vivo Dissociation of Gadolinium Chelates in Renally Impaired Rats

A Relaxometry Study

Nathalie Fretellier, MS,* Jean-Marc Idée, PharmD,* Anne Dencausse, PharmD,* Oussama Karroum, PhD,* Sylviane Guerret, PhD,† Nicolas Poveda, MS,* Gaëlle Jestin, BS,* Cécile Factor, PhD,* Isabelle Raynal, PhD,* Philippe Zamia, MS,* Marc Port, PhD,* and Claire Corot, PharmD*

Purpose: Investigation of dissociated versus chelated gadolinium (Gd) in plasma, skin, and bone of rats with impaired renal function after administration of ionic macrocyclic (gadoterate or Dotarem) or nonionic linear (gadodiamide or Omniscan) Gd chelates.

Materials and Methods: Subtotally nephrectomized Wistar rats were subjected to receive daily injections of 2.5 mmol/kg of Omniscan, gadodiamide without excess ligand, Dotarem, or saline ($n = 7-10$ rats/group) for 5 consecutive days. The Gd concentration was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry in skin, femur epiphysis, and plasma on completion of the study (day 11), and dissociated Gd^{3+} was measured in the plasma at day 11 (liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry). The r_1 relaxivity constant was measured in skin (at day 4 and day 11) and bone (day 11) to investigate the dissociated or chelated form of Gd found in tissue samples. Clinical and skin histopathologic studies were performed.

Results: Subtotal nephrectomy decreased creatinine clearance by 60%. No macroscopic skin lesions were observed in the Dotarem and Omniscan groups in contrast with the gadodiamide group (2 rats survived the study period and 4 of 10 rats showed skin ulcerations and scabs). Skin histopathologic lesions were in the range gadodiamide > Omniscan > Dotarem (similar to control rats). At day 11, the skin Gd concentration was lower in the Dotarem group (161.0 ± 85.5 nmol/g) as compared with the Omniscan (490.5 ± 223.2 nmol/g) and gadodiamide groups (mean value, 776.1 nmol/g; $n = 2$ survivors). The total Gd concentration in the femur was significantly higher in the Omniscan group than in the Dotarem group. At day 11, the dissociated Gd^{3+} concentration in plasma was below the limit of detection in the Dotarem group and was 1.5 ± 0.7 μ mol/L in the Omniscan group corresponding to $62\% \pm 15\%$ of the total Gd concentration. The dissociated Gd^{3+} concentration was 1.1 μ mol/L in gadodiamide rats ($n = 2$ survivors). In the skin, the in vivo r_1 relaxivity value increased from 4.8 ± 0.7 $mM^{-1}s^{-1}$ at day 4 to 10.5 ± 3.9 $mM^{-1}s^{-1}$ at day 11 in the Omniscan group, $P < 0.05$ (in vitro r_1 in skin, 3.5 $mM^{-1}s^{-1}$) and gadodiamide group, whereas no significant change was observed in the Dotarem group (2.8 ± 0.2 and 4.9 ± 2.8 $mM^{-1}s^{-1}$ at day 4 and 11, respectively, NS) (in vitro value in the skin, 3.2 $mM^{-1}s^{-1}$). In the femur, the in vivo r_1 relaxivity was higher in the Omniscan group (8.9 ± 2.1 $mM^{-1}s^{-1}$) (in vitro relaxivity, 4.5 $mM^{-1}s^{-1}$) and gadodiamide group (8.8 $mM^{-1}s^{-1}$, $n = 2$ survivors) than in the Dotarem group (3.8 $mM^{-1}s^{-1}$, $n = 1$ rat with measurable r_1 , since for 7 rats, $1/T_1 - 1/T_{1(\text{diamagnetic})} < 10\%$ of $1/T_{1(\text{diamagnetic})}$ because of low Gd concentration) (in vitro relaxivity value in the femur matrix, 3.1 $mM^{-1}s^{-1}$).

Conclusions: Unlike Dotarem, Omniscan and gadodiamide induced histologic skin lesions. At day 11, a higher Gd concentration was found in both skin and femur of Omniscan- and gadodiamide-treated rats than in Dotarem-treated rats. Relaxometry results indicate gradual in vivo dechelation and release of dissociated Gd^{3+} in a soluble form in renally impaired rats receiving Omniscan and gadodiamide, whereas Dotarem remained stable over the study period.

Key Words: nephrogenic systemic fibrosis, gadolinium chelates, gadodiamide, gadoterate, renal impairment, relaxometry

(*Invest Radiol* 2011;46: 292-300)

Many studies have demonstrated the presence of gadolinium (Gd) in skin biopsies from patients who experienced nephrogenic systemic fibrosis (NSF) after administration of a Gd chelate (GC), by energy dispersive x-ray spectroscopy combined with scanning electron microscopy,¹⁻⁴ energy-filtered transmission electron microscopy with electron energy loss spectroscopy,^{5,6} synchrotron x-ray fluorescence spectroscopy,⁷ or mass spectrometry.^{8,9} Unfortunately, although it is very unlikely that a water-soluble GC would persist for a very long time in skin samples, especially after processing with solvents,¹⁰ the techniques used in these studies are unable to formally discriminate between chelated and dissociated Gd.

The mechanism of NSF would be considerably elucidated by determining the dissociated versus chelated, and soluble versus insoluble states of Gd found in biopsy samples. For example, in patients with renal insufficiency and pro-inflammatory states, it has been proposed that free Gd may precipitate with phosphate to form insoluble salts that may be phagocytosed by macrophages which could subsequently release chemokines and cytokines involved in the attraction and activation of circulating fibrocytes.^{6,11-13} Alternatively, other authors have reported a direct stimulating effect of "free," soluble Gd^{3+} on fibroblast proliferation in vitro.^{14,15} It has also been speculated that dissociated and soluble Gd^{3+} may interfere with fibrillogenesis and hence with collagen production in the dermis.¹⁶ On the other hand, on the basis of in vitro studies performed at high GC concentration,¹⁷ Newton and Jiménez have speculated that the GC molecules themselves (ie, without in vivo dissociation) may have a direct pro-inflammatory and profibrotic effect.¹⁸

The aim of this study was to characterize the dissociated or chelated state of Gd in plasma, skin, and trabecular bone after administration of marketed GC, representative of 2 distinct categories with opposite physicochemical properties: a linear, nonionic GC (both low thermodynamic and kinetic stabilities) and an ionic, macrocyclic GC (both high thermodynamic and kinetic stabilities)^{19,20} to rats with impaired renal function. Plasma total Gd concentration was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and dissociated Gd concentration was measured by high

Received July 28, 2010; accepted for publication (after revision) September 30, 2010.

From the *Research Division, Guerbet, Roissy Charles de Gaulle Cedex, France; and †Pathology Department, Novotec, Lyon, France.

Reprints: Nathalie Fretellier, MS, Research Division, Guerbet, BP 57400, 95943 Roissy Charles de Gaulle Cedex, France. E-mail: nathalie.fretellier@guerbet-group.com.

Copyright © 2011 by Lippincott Williams & Wilkins
ISSN: 0020-9996/11/4605-0292

performance liquid chromatography (HPLC) coupled to an ICP-MS system.²¹ Because HPLC-ICP-MS cannot be used in solid biologic matrices such as skin or bone tissues for practical reasons, another approach, relaxometry, was selected. For that purpose, we assumed that *in vivo* relaxometry of tissue samples (skin and bone) would be able to discriminate between the dissociated, chelated, or insoluble state of Gd, based on their different effects on the relaxation times of adjacent proton spins.^{22,23}

MATERIALS AND METHODS

Animal Study

All studies were carried out on male, Wistar rats from CERJ (Centre d'Élevage René Janvier, Le Genest Saint Isle, France), aged 6 weeks and weighing 235 ± 23 g.

The animals underwent subtotal (5/6th) nephrectomy (SNx)^{24,25}: the right kidney was exposed through a flank incision, the adrenal gland was separated from the upper pole, and the kidney was decapsulated. The renal pedicle was ligated and the right kidney was removed. The left kidney was subsequently decapsulated, and the adrenal gland was separated from the upper pole. Ligatures were placed around the upper and lower poles and the poles were excised. Animals were anesthetized with ketamine and xylazine. An intravenous injection of 1.0 mL/kg of saline was administered at completion of surgery to compensate for blood loss. The surgical procedure was carried out at the CERJ laboratory.

The animals were housed 1 per cage at an ambient temperature of $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, hygrometry of $55\% \pm 10\%$, with 12/12 light/dark cycles. Animals had free access to water and standard animal chow (reference A04, SAFE, Augy, France) containing (per kilogram) 5.9 g phosphorus, 8.3 g calcium, 2.5 g sodium, 6.7 g potassium, 2 g magnesium, 85 mg zinc, and 240 mg iron. The protein concentration was 16.1%.

All experimental procedures were carried out according to the French rules on animal welfare and complied with the European Economic Community Directive (2010/63/EU). The protocol was approved by the local ethics committee.

A total of 33 male, SNx Wistar rats were allocated to daily treatment with either saline (5.0 mL/kg), 500 mM Dotarem (meglumine gadoterate; Guerbet, Villepinte, France, batch 8GD051B), 500 mM Omniscan (gadodiamide; GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom, batch 10758384), or nonformulated Omniscan (ie, without the 25 mM excess ligand caldiumide present in the commercial solution of Omniscan) (495 mmol/L, synthesized at the Guerbet Research Department). We shall use the term "Omniscan" for the marketed product, and the term "gadodiamide" for the pure drug substance. We shall use the term "Dotarem" as a synonym of meglumine gadoterate. The rats received saline or 2.5 mmol/kg of each GC intravenously through the tail vein at a rate of 1.0 mL/min, daily for 5 consecutive days, starting 10 days after subtotal nephrectomy. This period was defined during a preliminary study in which 10 SNx rats were compared with 4 control, sham-operated animals. The creatinine clearance of the SNx rats was found to be significantly decreased from the first measurement (day 7) when compared with sham-operated rats ($P < 0.05$). Renal function remained stable in the SNx group throughout the study (0.38–0.48 mL/min/100 g body weight). Creatinine clearance was 1.0 to 1.2 mL/min/100 g body weight in the sham-operated control group.

The rats were killed (exsanguination under isoflurane anesthesia) 11 days after the first administration.

The rats were examined for macroscopic skin changes before the first injection and then daily throughout the study. On day 4, the backs of the animals were shaved for biopsy (6-mm diameter biopsy punch, Labonord, Templemars, France) and better visualization of

potential lesions. The backs and abdomens were shaved again at completion of the study. Skin samples were taken from the backs of animals (normal areas and areas presenting lesions).

A terminal blood sample was obtained, and skin of the back and bone (femur epiphysis) were harvested for Gd assay and relaxometry studies.

All injections, blood, and skin sampling were performed under isoflurane/oxygen (3.5% induction, then 2.5%, 1 L/min oxygen) anesthesia.

Histology

Histopathologic examinations were performed under blinded conditions by a certified histopathologist (S.G.) in accordance with the guidelines of the Society of Toxicologic Pathology.²⁶

Skin samples were fixed in 4% neutral buffered formalin. After routine dehydration, the samples were embedded in paraffin, sectioned (5 μm thickness) for hematoxylin-eosin-saffron staining for topographic analysis, picosirius red staining to detect the presence of collagen, and Alcian blue staining to detect acidic mucopolysaccharides. Immunohistochemical staining was performed to detect CD34 and transforming growth factor (TGF)- β_1 positive cells using anti-CD34 goat antibody (diluted 1:1000, R&D Systems, Minneapolis, MN) and anti-TGF- β_1 rabbit antibody (diluted 1:250, GeneTex, San Antonio, TX) using the ImmPRESS polymerized reporter peroxidase staining (ImmPRESS anti-goat Ig [peroxidase] kit [MP 7405] and ImmPRESS antirabbit Ig [peroxidase] kits [MP 7401], respectively (Vector Laboratories, Burlington, CA).

Gadolinium Measurement

Gd was measured in plasma, skin, and trabecular bone samples by ICP-MS on ELAN DRC Plus (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Waltham, MA). A standard curve of inorganic Gd (0.64 nmol/L–1.30 $\mu\text{mol/L}$) in 6.5% HNO_3 was used by monitoring the response of the ^{157}Gd isotope. The acceptance limits (total error) were set at $\pm 14\%$. Results are expressed in nmol of Gd per gram tissue wet weight (skin and bone samples) or μmol per liter of plasma. The limit of quantification (LOQ) was 0.64 nmol/L. Samples above the limit of detection (LOD) (0.19 nmol/L) but below the LOQ were given an arbitrary value of 0.32 nmol/L.

The plasma dissociated Gd^{3+} concentration was measured by HPLC connected to an ICP-MS system according to Frenzel et al.²¹ The HPLC system (Series 200 LC PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Waltham, MA) was equipped with a 1-mL chelating Sepharose column (HiTrap, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and was connected to an ICP-MS system (ELAN DRC Plus). Five- μL aliquots (a 300- μL sample was needed to take the dead volume into account) were injected into the column which was equilibrated with 10 mmol/L bis-Tris buffer (pH 6). The HPLC flow rate was set at 1 mL/min.

The signal intensity of the ^{157}Gd isotope was continuously recorded and displayed on a chromatogram. The fraction of free Gd^{3+} was measured by peak area analysis.

The linear response curve and recovery of the released free Gd^{3+} were measured by testing increasing concentrations of Gd nitrate (1, 5, 10, 20, 50, and 100 μM) in water and 0.5, 1, 2, 5, and 10 μM of Gd nitrate in rat plasma.

The stability over time was checked during the sequence by quality controls (theoretical concentration = 4 $\mu\text{mol/L}$, measured mean value, 3.71 ± 0.08 $\mu\text{mol/L}$ [$n = 5$] (mean \pm standard deviation [SD]). The LOQ of the method was 0.5 $\mu\text{mol/L}$.

Relaxometry Measurements

Both epiphyses from 1 femur (about 500 mg) and a dorsal skin sample (biopsy, 30 mg and at sacrifice, 500 mg) were used for relaxometry measurements. One 1:11 dilution was performed in

milliQ water to mash samples. Mashing of samples differed according to the matrix: bone was first placed in the liquid nitrogen (−196°C) and subsequently crushed manually. Large amounts of matrices (bone and skin) were first mashed with an Ultra-Turrax homogenizer (IMLAB, Lille, France) followed by a Precellys homogenizer (Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). Small amounts of matrices were mashed with a Precellys homogenizer. Before measurement, the suspension was mixed to avoid sedimentation and was eventually checked for a homogeneous aspect.

Relaxometry study was performed (100 μL sample) with a Minispec mq 60 (Bruker Optics, Ettlingen, Germany), operating at a proton frequency of 60 MHz, and a preset temperature of 37°C ± 2°C). The Minispec standard software was a 2-pulse inversion-recuperation spin echo with a fixed relaxation delay of 5 × T₁.

When the 1/T₁ − 1/T₁(diamagnetic) value was less than 10% of 1/T₁(diamagnetic) in the absence of Gd precipitation (ie, because of a low total Gd concentration in the sample), the r₁ relaxivity could not be measured.

The influence of mashing of skin and bone tissues on r₁ relaxivity was studied to ensure that there was no alteration in the molecular form of the GC present in the sample. The r₁ relaxivity was measured before and after mashing of samples with the Precellys and/or the Ultra-Turrax homogenizer. Dotarem remained stable regardless of the mashing technique. Omniscan remained stable after Ultra-Turrax mashing but was found to be degraded (overlapping ratio of 124%, ie, an increase in the r₁ value from 3.8 to 4.7 mM^{−1}s^{−1}) after 8 mashing sequences with the Precellys homogenizer. The mashing technique was therefore modified (2 sequences at 15-minute interval) to avoid this degradation.

The GC concentration in tissue samples was corrected for water content with a proportion of 97% water being estimated on the basis of unpublished studies. All samples were measured individually at 1.42 T on 100 μL samples.

Relaxometry studies (spiking in vitro studies) on biologic matrices were performed by spiking with Dotarem and Omniscan (both from commercial solutions, 500 mM) (range of 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, and 1 mM) on water, rat plasma, skin, and femur epiphysis from nontreated rats (final test volume, 300 μL) at a proton frequency of 60 MHz and 37°C. Gd acetate (408 mM, similar concentration range as GC) was used to investigate the effect of free, soluble Gd. The effect of precipitated, amorphous Gd was tested with phosphate, hydroxide, and carbonate salts of Gd (5 mg in 100 μL of MilliQ water or 100 μL of skin matrix sample). Relaxometry studies were performed immediately after spiking the matrix. Gd concentration was measured by ICP-MS.

We termed all experiments performed by spiking GC on tissue matrices (to obtain the reference range of r₁ relaxivities) as “in vitro studies” and all the experiments that were performed on test animals as “in vivo studies.”

On the basis of in-house in vitro relaxometry studies (Dotarem in water, 37°C, at 20 MHz), the uncertainty of relaxivity r₁ measurements (Gd concentration measured by ICP-MS) was set at r₁ ± 23%. The in vitro r₁ relaxivity range represents the in vitro r₁ relaxivity value (obtained from spiking studies) ± uncertainty of 23%.

For ICP-MS and relaxometry studies, tissue samples were stored at −80°C.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD. SD was given only for samples >2 rats. The in vivo relaxivity r₁ values were compared using a *t* test. The 95% confidence intervals on the in vivo relaxivity r₁ mean were calculated (mean ± 2 standard error of the mean) and were compared with the in vitro relaxivity r₁ values ± 23% (in vitro r₁ range). If the confidence interval on the in vivo relaxivity r₁ mean was found to be fully included in the in vitro relaxivity r₁ range, the in vivo Gd state was considered equivalent to the in vitro Gd state (chelated, dissociated, or precipitated according to the respective relaxivity r₁ value), and otherwise different.

Assuming a normal distribution of values, Gd concentration measurements were tested globally with analysis of variance with repeated measures. In the case of a significant difference, pairwise comparisons were performed using a *t* test.

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) or SAS (Statistical Analysis Software, Cary, NC). A *P* ≤ 0.05 was considered to indicate a significant difference.

RESULTS

Clinical and Histologic Data

Clinical data are shown in Table 1. Epidermal lesions (ulcerations and scabs) on the neck, back, and abdominal skin were found in 4 of the 10 rats treated with gadodiamide. These lesions were observed for the first time at day 5 (ie, the day of the last injection)

TABLE 1. Macroscopic Skin Lesions and Other Clinical Symptoms Observed After Treatment With Dotarem, Omniscan, Gadodiamide, or Saline (5 × 2.5 mmol/kg Daily)

Treatment	No. Rats per Group	No. Live Rats at Completion of the Study (Day 11)	No. Rats With Macroscopic Skin Lesions	Other Symptoms
Saline	7	7	0	—
Dotarem	8	8	0	—
Omniscan	8	8	0	—
Gadodiamide	10	2	4 (scab formation and ulceration)	Prostration, piloerection, and loss of bodyweight

TABLE 2. Summary of Skin Histologic Findings

Treatment	Summary of Histologic Findings
Control	Very few histopathologic lesions. Dermis: constant thickness and low cellularity. Extracellular matrix: dense underneath the epidermis and homogeneous in the dermis. Some CD34+ or TGFβ ₁ + positive cells.
Dotarem	Very few histopathologic lesions. Dermis: constant thickness and low cellularity. Extracellular matrix: homogeneous. Some CD34+ or TGFβ ₁ + positive cells.
Omniscan	Small superficial epidermal lesions and degradation of collagen fibers in the dermis with disorganization of the extracellular matrix. Some CD34+ or TGFβ ₁ + positive cells.
Gadodiamide	Numerous superficial epidermal lesions, inflammation, necrosis, and increased cellularity, as well as large areas of complete degradation of the dermal extracellular matrix. CD34 or TGFβ ₁ positive staining on spindle-shaped cells and dendrocytes in the dermis.

for 2 rats and at day 9 for 2 rats. In the gadodiamide group, 8 rats were either found dead or had to be killed for ethical reasons. The 2 surviving rats treated with gadodiamide experienced a loss of body weight.

No macroscopic skin lesions were found in the rats treated with Dotarem or Omniscan or in the control group. No significant difference in body weight changes was observed between these groups. Briefly, very few histologic lesions were reported in the Dotarem-treated group or in the control group. Small superficial epidermal lesions and some degradation of collagen fibers in the dermis were observed in the Omniscan group. Numerous superficial epidermal lesions, inflammation, necrosis, and increased cellularity as well as large areas of complete degradation of the dermal extracellular matrix were observed in the gadodiamide group.

TABLE 3. Total Gadolinium Concentration in Rat Plasma at Days 1, 5, and 11 (ICP-MS) (Mean ± SD)

	Gadolinium Concentration (No. Rats)		
	Day 1 (mmol/L)	Day 5 (μmol/L)	Day 11 (μmol/L)
Control	10 ⁻⁶ ± 2.10 ⁻⁶ (n = 7)	0.77 ± 0.99 (n = 7)	0.01 ± 0.02 (n = 7)
Dotarem	11.1 ± 1.2 (n = 8)	6.8 ± 8.4 (n = 8)	3.3 ± 3.1 (n = 8)
Omniscan	11.1 ± 1.5 (n = 8)	5.6 ± 2.6 (n = 8)	2.3 ± 1.4 (n = 8)
Gadodiamide	11.9 ± 1.9 (n = 10)	12.7 ± 10.4 (n = 8)	2.0 (n = 2)

ICP-MS indicates inductively coupled plasma mass spectrometry; SD, standard deviation.

CD34+ or TGFβ₁ + positive cells after immunostaining were found on spindle-shaped cells and dendrocytes in the dermis of all test groups, including the control rats (Table 2).

Total and Dissociated Gadolinium Levels in the Plasma

Plasma total Gd concentrations at days 1, 5, and 11 are shown in Table 3.

Dissociated Gd concentrations (measured by HPLC-ICP-MS) are shown in Figure 1. The dissociated Gd concentration measured in the plasma of Dotarem-treated rats at the time of sacrifice was below the limit of detection (LOD) value but was 1.4 ± 0.7 μmol/L in Omniscan-treated rats and 1.1 μmol/L (n = 2 rats) in the gadodiamide group.

The dissociated/total Gd concentration ratio was 62.0% ± 15.0% in the Omniscan group, and 52.9% in the gadodiamide group. No dissociated Gd was detected in the Dotarem group (all values < LOD).

Total Gadolinium Levels in Skin

When measured at day 4 (ie, during the injection period), total Gd concentration in skin samples was statistically similar in the Dotarem, Omniscan, and gadodiamide groups. At day 11, a dramatic decrease in the Gd concentration was measured in all treated groups (Fig. 2). The Gd concentration was lower in the Dotarem group (161.0 ± 85.5 nmol/g) than in the Omniscan (490.5 ± 223.2 nmol/g) and the gadodiamide groups (mean, 776.1 nmol/g, n = 2), but this difference was not statistically significant.

Total Gadolinium Levels in Femur

The total Gd concentration was higher in the femur of the 2 surviving rats treated with gadodiamide (mean, 631.4 nmol/g) than in the animals of the Dotarem (98.8 ± 53.4 nmol/g) and Omniscan groups (353.1 ± 81.4 nmol/g). The total Gd concentration in the

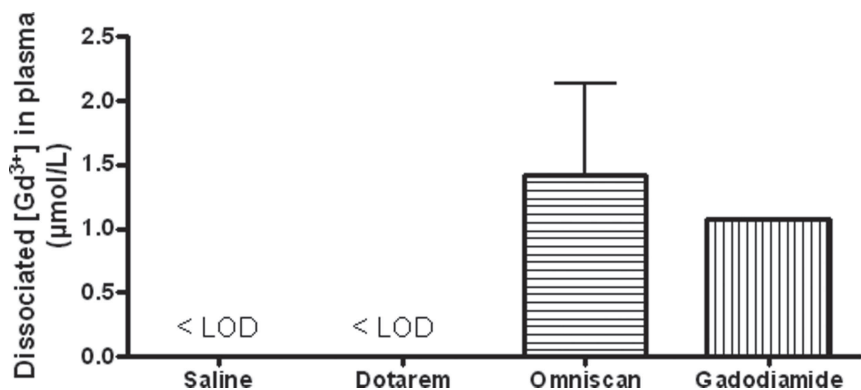


FIGURE 1. Dissociated Gd concentration in plasma at sacrifice (day 11) (HPLC-ICP-MS measurement, n = 8 rats/group except n = 2 for gadodiamide and 7 for saline). LOD indicates limit of detection.

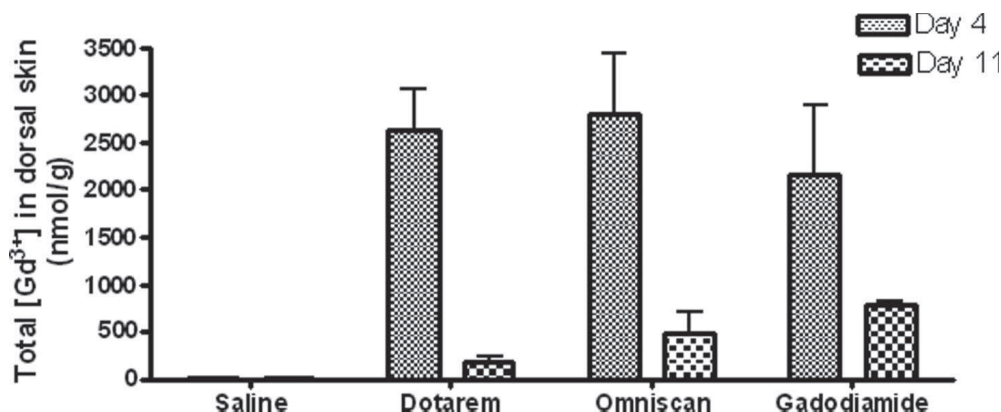


FIGURE 2. Total Gd concentration observed in skin samples of subtotally (5/6th) nephrectomized rats at day 4 (biopsy) and day 11 (sacrifice) (ICP-MS measurement). The rats received intravenous injections of 2.5 mmol/kg/d of GC or 5 mL/kg/d of saline for 5 consecutive days.

FIGURE 3. Total Gd concentration in bone (femur epiphysis) tissue of rats with subtotal (5/6th) nephrectomy at day 11 (ICP-MS measurement, n = 8 rats/group except n = 2 surviving rats for gadodiamide and 7 rats for saline). The rats received intravenous injections of 2.5 mmol/kg/d of GC or 5 mL/kg/d of saline for 5 consecutive days. *P < 0.05.

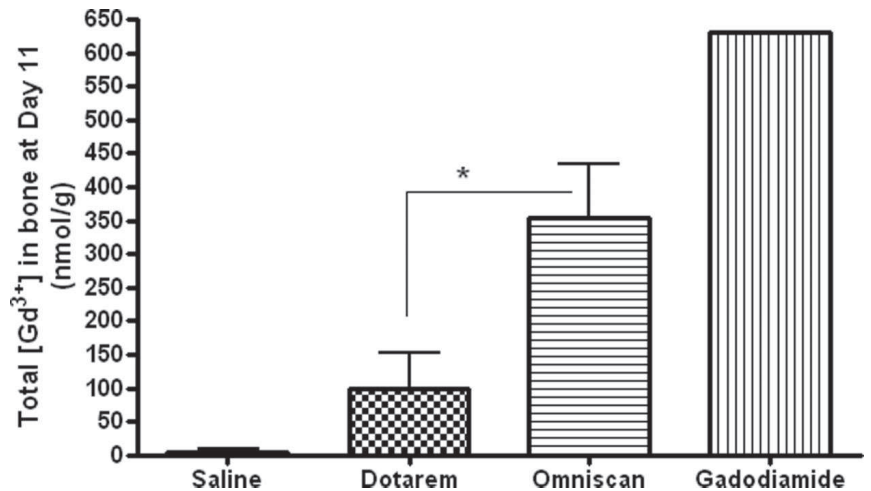


TABLE 4. r₁ Relaxivity Value (Spiking Studies With Dotarem, Omniscan, and Gd Acetate (60 MHz, 37°C) in Water and Various Tissue Matrices

Matrix	Ex Vivo r ₁ Relaxivity (mM ⁻¹ s ⁻¹)		
	Dotarem	Omniscan	Gd acetate
Water	3.0 (2.3–3.7)	3.1 (2.4–3.8)	10.4 (7.6–12.8)
Plasma	3.7 (2.9–4.6)	4.1 (3.2–5.0)	15.4 (11.9–19.0)
Trabecular femur	3.1 (2.4–3.8)	4.5 (3.5–5.5)	15.8 (12.2–19.4)
Skin	3.2 (2.5–4.0)	3.5 (2.7–4.3)	—

Gd indicates gadolinium.

femur was higher in the Omniscan group than in the Dotarem group (P < 0.05) (Fig. 3).

Relaxometry Studies

The in vitro r₁ relaxivity values obtained in water, rat plasma, skin, and trabecular femur matrices (spiking studies with Dotarem, Omniscan, and Gd acetate) are shown in Table 4.

The in vitro r₁ relaxivity values of precipitated forms of Gd (phosphate, hydroxide, and carbonate) in water and in skin are shown in Table 5.

Relaxometry Values in the Skin

On in vivo studies, the skin r₁ relaxivity value increased from 4.8 ± 0.7 mM⁻¹s⁻¹ at day 4 to 10.5 ± 3.9 mM⁻¹s⁻¹ at day 11 in the Omniscan group (P < 0.05 vs. day 4), whereas no significant change was observed in the Dotarem group (2.8 ± 0.2 and 4.9 ± 2.8 mM⁻¹s⁻¹ at days 4 and 11, respectively, NS) (Fig. 4). In the gadodiamide group, the r₁ value was 5.5 ± 1.2 mM⁻¹s⁻¹ at day 4 (n = 8) and 11.4 mM⁻¹s⁻¹ at sacrifice (mean for n = 2 survivors). At day 11, the r₁ relaxivity values measured in skin samples of the Omniscan and gadodiamide groups were higher as compared with those in vitro range. The r₁ relaxivity value for Dotarem was included in the in vitro range.

Relaxometry Values in the Femur

In the trabecular femur, the in vivo r₁ relaxivity value was higher in the Omniscan group (8.9 ± 2.1 mM⁻¹s⁻¹) (in vitro value: 4.5 mM⁻¹s⁻¹) and gadodiamide group (8.8 mM⁻¹s⁻¹) than in the Dotarem group (3.8 mM⁻¹s⁻¹) (Fig. 5). In the Dotarem group, only 1 rat had measurable r₁, as the 1/T₁ - 1/T₁(diamagnetic) value was less than 10% of 1/T₁(diamagnetic) in the remaining 7 rats due to the low total Gd concentration (8 ± 2 μmol/L). The in vivo r₁ relaxivity

TABLE 5. r₁ Relaxivity Value (60 MHz, 37°C) of 3 Precipitated Gd Salts in Water and Skin

	r ₁ Relaxivity (mM ⁻¹ s ⁻¹) in	
	Water	Skin
Gd phosphate	0.04 (0.03–0.05)	0.02 (0.015–0.025)
Gd hydroxide	0.29 (0.22–0.36)	0.29 (0.22–0.36)
Gd carbonate	0.01	0.08 (0.06–0.10)

Gd indicates gadolinium.

values measured in femur samples of both Omniscan and gadodiamide were higher than those in the vitro range.

Relaxometry Values in the Plasma

As the 1/T₁ - 1/T₁(diamagnetic) value was less than 10% of the 1/T₁ (diamagnetic) value for all plasma samples at day 11, no in vivo r₁ relaxivity value was obtained in the plasma, regardless of treatment.

DISCUSSION

Subtotal nephrectomy in rats is classically described as a model of chronic kidney disease and renal fibrosis,^{24,25} and this model has been widely used to investigate the profibrotic effects of GC.^{27–29} As described in these studies, a repeated GC injection schedule was used in the present study. At 2.5 mmol/kg, the dose of GC used in the rat was higher, per unit body weight, than the dose range of 0.1 to 0.3 mmol/kg classically used for magnetic resonance imaging contrast procedures in patients.³⁰ However, this dose range was considered to be appropriate for chronic studies in rats, as comparative drug doses between species must be normalized to body surface area rather than body weight. The US Food and Drug Administration recommends the use of a 6-fold increase to obtain a human equivalent drug dose for rats.³¹ On this basis, a dose of 0.4 mmol/kg GC in human being would be equivalent to 2.5 mmol/kg in the rat.

Two structurally distinct categories of GC are currently marketed: (a) “macrocyclic” chelates (gadoterate or Dotarem, gadoteridol or ProHance, gadobutrol or Gadovist), in which the Gd³⁺ ion is “caged” in the preorganized cavity of the ligand, and (b) “linear” chelates (gadopentetate or Magnevist, gadobenate or MultiHance, gadodiamide or Omniscan, gadoversetamide or OptiMARK, gadofosveset or Ablavar, and gadoxetate or Eovist/Primovist). GC can also be either “nonionic” (in which the number of carboxyl groups is reduced to 3, neutralizing the 3 positive charges of the Gd³⁺) or

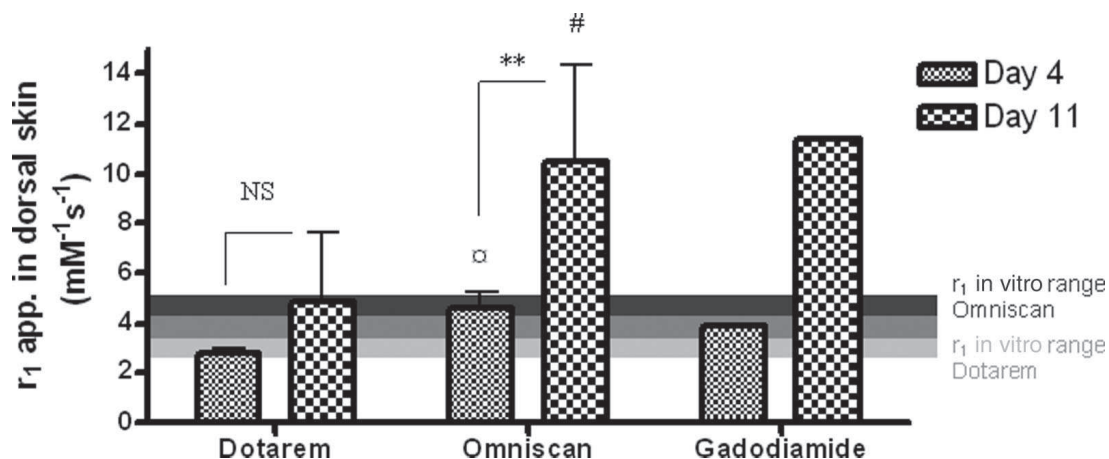


FIGURE 4. Relaxivity in vivo r_1 apparent (app.) values (60 MHz, 37°C) in skin samples of subtotally (5/6th) nephrectomized rats treated with Dotarem, Omniscan, or gadodiamide at day 4 (ie, during the 5-day injection period) and day 11 (sacrifice). $\alpha P < 0.001$ versus Dotarem at Day 4, # $P < 0.05$ versus Dotarem at day 11. ** $P < 0.01$. NS indicates non significant.

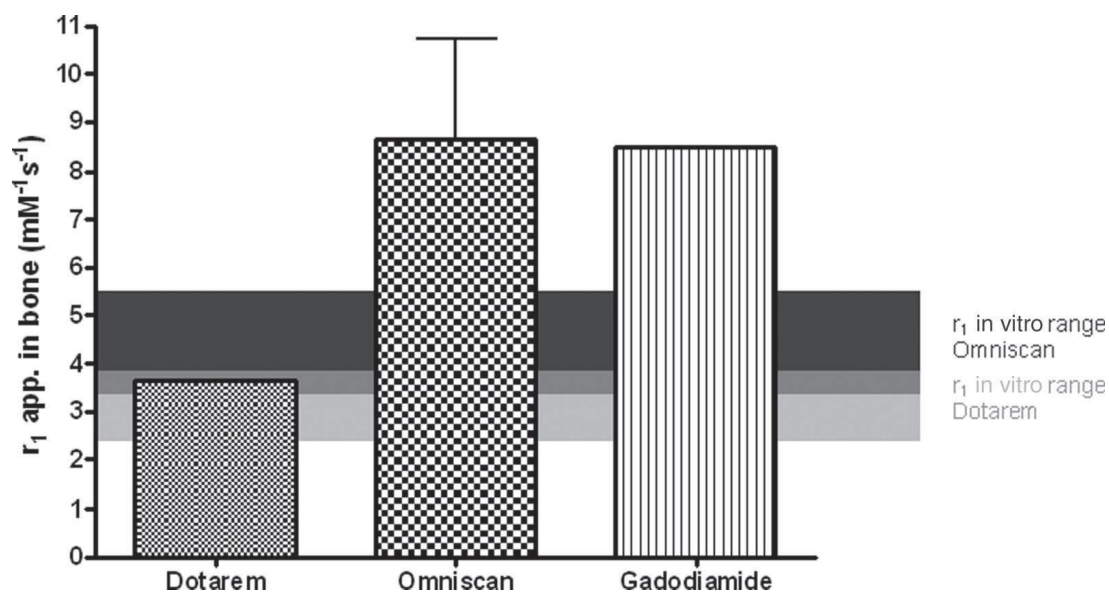


FIGURE 5. Relaxivity in vivo r_1 apparent (app.) values (60 MHz, 37°C) in bone (femur epiphysis) samples of subtotally (5/6th) nephrectomized rats treated with Dotarem (n = 1), Omniscan (n = 8), or gadodiamide (n = 2) measured at day 11 (sacrifice). In the Dotarem-treated group, only one rat had measurable r_1 , as the $1/T_1 - 1/T_{1(\text{diamagnetic})}$ value was less than 10% of $1/T_{1(\text{diamagnetic})}$ in the remaining 7 rats due to the low Gd concentration.

“ionic” (in which the remaining carboxyl groups are salified with meglumine or sodium).¹⁹ Because of their relatively low stability, pharmaceutical solutions of some GC include a relatively large amount of free ligand, or sodium salt of calcium complexes. These excipients are intended to ensure the absence of free Gd^{3+} cations in pharmaceutical solutions for the duration of their shelf lives. An excess in free, dissociated ligand actually reduces the dissociated Gd concentration in the pharmaceutical solution and acts like a “Gd sponge.” The least stable agents such as Omniscan have considerably larger amounts of excess ligand (25 mmol/L of caldiumide, ie, 5% of the Omniscan concentration) than the most stable GC. There is no excess ligand in the approved pharmaceutical formulation of Dotarem.¹⁹

The majority of cases of NSF reported in the literature to date have been associated with administration of the nonionic, linear GC Omniscan,³² although several reports have also concerned the ionic linear Magnevist and the nonionic linear GC OptiMARK.^{33–36} In the present study, high morbidity and mortality were observed among

the rats treated with gadodiamide, a result consistent with the literature.^{28,37} This underlines the harmful role of dissociated Gd present in the Omniscan solution in the absence of the free ligand caldiumide. No macroscopic lesions were observed in the Dotarem and Omniscan groups. Virtually no histologic lesions were observed in the Dotarem group, whereas degradation of collagen fibers was observed in the dermis of Omniscan-treated rats. Other authors have reported macroscopic lesions in rats treated with Omniscan: in 1 study,²⁸ lesions were observed by the eighth day of 5 mmol/kg daily injections to SNx rats (2/4 rats involved). The (daily and cumulative) doses used in Grant study²⁸ were much higher than those used in the present study. In another study also involving SNx rats,²⁷ 3 of the 12 Omniscan-treated rats developed macroscopic skin lesions starting on day 5 after the last injection. The discrepancy between our data and these results may be explained by the early sacrifice deliberately chosen in our study (to obtain sufficiently high tissue Gd concentrations to allow relaxometry studies). It is also noteworthy that,

even in the absence of macroscopic lesions, histologic skin lesions (including small superficial epidermal lesions) were observed in the Omniscan group.

When measured at day 4, the total Gd concentration in dorsal skin was similar in all the groups, an effect consistent with the fact that skin sampling was performed during the injection week. At day 11 (ie, at sacrifice), the Gd concentration was higher in the skin of Omniscan-treated rats than in that of Dotarem-treated rats. The Gd level in bone tissue was also higher in the Omniscan groups than in the group receiving the macrocyclic agent Dotarem. This result is consistent with another study.³⁸ Sieber et al found a qualitative correlation between Gd concentrations in rat skin and the development of NSF-like skin lesions.³⁷ They reported that the highest Gd concentrations were measured after administration of gadodiamide (compared with Omniscan and Magnevist, a more stable, ionic linear GC). In the present study, Gd concentration at sacrifice was 776 nmol/g for gadodiamide ($n = 2$ surviving rats), 490 ± 223 nmol/g for Omniscan, and 161 ± 85 nmol/g for Dotarem. A similar pattern was observed in the femur (Fig. 3).

A similar plasma clearance profile was observed for Dotarem and Omniscan over the time windows selected in this study, which is perfectly consistent with the fact that both nonspecific GC share a similar pharmacokinetic behavior.^{20,30} However, when taking into account the dissociated Gd^{3+} concentration measured by the highly sensitive HPLC-ICP-MS technique, the Gd^{3+} concentration measured in the plasma of Dotarem-treated rats at sacrifice was below the LOD, but was in the micromolar range in the Omniscan-treated groups. The relatively high volume of plasma required for HPLC-ICP-MS measurements did not allow this assay to be performed at earlier time points.

We report, for the first time, *in vivo* dissociation of a linear GC but not of a macrocyclic molecule. In their *in vitro* study, using the same measurement technique, Frenzel et al ranked GC in the following order according to their stabilities in human serum at pH 7.4 and 37°C (% of Gd release after 15 days and initial rate): nonionic linear GC > ionic linear GC > macrocyclic GC (for which values were < LOQ).²¹ However, because of the modalities of preparation of tissue samples, HPLC-ICP-MS cannot be used to measure the dissociated Gd concentration ratio in solid tissues such as skin or bone. Another approach must therefore be used. *In vivo* relaxometry study of tissue samples is a useful tool for investigating the dissociated versus chelated state of Gd after systemic administration of GC.

Paramagnetic GC induce an increase in the longitudinal and transverse relaxation rates ($1/T_1$ and $1/T_2$, respectively) of solvent nuclei.^{22,23} The diamagnetic and paramagnetic contributions to relaxation rates are additive and given by the following equation:

$$1/T_i(\text{observed}) = 1/T_i(\text{diamagnetic}) + 1/T_i(\text{paramagnetic}), \quad (1)$$

where $i = 1$ or 2 and $1/T_i(\text{diamagnetic})$ refers to the solvent relaxation rate in the absence of a paramagnetic species and $1/T_i(\text{paramagnetic})$ is the additional paramagnetic contribution of the GC.²² Relaxivities (r_1 and r_2) are defined as the slope of the linear regression generated from the solvent relaxation rates versus the concentration of the paramagnetic GC²²:

$$1/T_i(\text{observed}) = 1/T_i(\text{diamagnetic}) + r_i [GC], \quad (2)$$

where $[GC]$ is the concentration of the Gd chelate and

$$r_i = [1/T_i(\text{observed}) - 1/T_i(\text{diamagnetic})]/[GC] \quad (3)$$

Relaxivities of all GC in water and plasma at various fields are available in the literature.³⁹ The r_1 relaxivity of Dotarem and Omniscan by “spiking” these GC in water, rat plasma, and the tissue matrices investigated in our *in vitro* study (skin and trabecular femur) were measured at the same magnetic field as our *in vivo* studies. The results obtained in both water and plasma showed good agreement with the r_1 relaxivity values published by Rohrer et al at the same (clinical) magnetic field.³⁹ It has been clearly established that the relaxivity of GC is higher in plasma than in water, and that relaxivity increases with macromolecular content.^{40,41} Our *in vitro* spiking results are fully consistent with these differences in relaxivity based on the molecular composition of the biologic matrix.

It can be assumed that, provided the samples are processed under strictly identical conditions, an increase in the r_1 relaxivity value reflects the dissociation state of Gd^{3+} that remains soluble in the extracellular space, as the r_1 relaxivity values of Gd acetate in water ($10.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) and in the biologic matrices plasma and bone (15.4 and $15.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively) are higher than those of either Dotarem or Omniscan. Moreover, the possible binding of dissociated Gd to proteins or other biomolecules should further increase the apparent relaxivity value.^{23,42} Conversely, a decrease in the r_1 value would be consistent with precipitation of Gd in a form with little or no influence on the longitudinal relaxation rate of protons, as demonstrated by the relaxivity values obtained for the 3 precipitated forms of Gd (Table 5).

For the first time, our relaxometry results indicate a gradual *in vivo* dissociation of the linear, nonionic GC Omniscan in the skin and bone of renally impaired rats, with release of soluble Gd, while the ionic and macrocyclic GC Dotarem remained stable throughout the study. These results are in line with those of plasma dissociated Gd concentration measurement studies using HPLC-ICP-MS.

Thermodynamic stability (which reflects the affinity of Gd for its ligand) and kinetic stability (which reflects the rate at which the equilibrium between the metal and its ligand is reached) are both essential to rigorously describe the physicochemical characteristics of a GC.¹⁹ The higher thermodynamic and kinetic stability associated with macrocyclic agents compared with linear GC¹⁹ has been directly²¹ or indirectly^{43–49} confirmed by numerous studies.

An *in vivo* dissociation of linear, nonionic GC has been suspected for a long time⁴⁸ but has not been formally demonstrated. Numerous studies have demonstrated the presence of Gd in skin biopsies from NSF patients, by means of sophisticated techniques.^{1–7} However, it should be stressed that, just as these approaches, the quantitative and elementary ICP-MS technique is unable to formally discriminate between chelated and dissociated Gd.

Our data might appear to challenge the results of a recent study which, using energy dispersive x-ray spectroscopy coupled with scanning electron microscopy, concluded on the presence of insoluble tissue deposits of Gd with coassociated elements (sodium, calcium, and phosphorus, sometimes iron or zinc) in skin biopsies of NSF patients, sampled between 2 weeks and 3 years after GC exposure.⁵⁰ Another study, where autopsy skin tissues from a NSF patient were examined using synchrotron x-ray fluorescence microscopy and extended absorption fine structure spectroscopy, also concluded that the cutaneous Gd deposits found consisted of a Gd phosphate insoluble material.⁵¹ Actually, both states of Gd (ie, soluble, protein-bound, and precipitated) are not mutually exclusive. It can be speculated that following *in vivo* dissociation of gadodiamide and according to the time-point and biologic (extracellular or intracellular) compartment considered, Gd may be present in both the states.

Possible ligands in plasma include phospholipids, amino acids, peptides, nucleotides, proteins, and many other compounds present in blood carrying oxygen-donor atoms.⁵² The present study was not designed to investigate *in vivo* biospeciation. This issue is

obviously crucial, as it determines the role of Gd in the mechanism of NSF.

Provided samples are stored under good conditions and the Gd concentration is sufficient, the relaxometry approach presented here could be used in human biopsy samples from NSF or control patients to investigate the dissociated versus chelated and soluble versus precipitated forms of Gd.

Our data do not provide any information on the compartment (intracellular or extracellular) in which the dissociation of Omniscan occurs. In vitro studies suggest that the incubation of Omniscan with cultured cells was associated with a shift in the dissociation equilibrium that, in turn, resulted in a net transfer of Gd^{3+} ions onto the cell membrane followed by their internalization. Furthermore, removal of phosphate from the culture medium was associated with a 10-fold decrease in Gd cellular uptake, suggesting a transmetalation process.⁴⁵ However, this does not necessarily imply the formation of insoluble $GdPO_4$. The addition of 10 mM phosphate to human serum accelerates the release of soluble Gd^{3+} from gadodiamide.²¹

Although Omniscan was shown to dissociate in vivo, unlike the macrocyclic GC Dotarem, the exact role of Gd in the mechanism of NSF remains speculative. Numerous prospective^{28,29,37,38} and retrospective⁵³ in vivo preclinical studies have been performed to better understand the pathophysiology of the disease. Soluble Gd^{3+} ($GdCl_3$) (2–60 μM) promotes mouse embryo fibroblast growth through activation of both ERK (extracellular signal-regulated kinase) and PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) pathways.¹⁵ A proliferative effect of $GdCl_3$ (5 and 10 μM) has also been shown on human dermal fibroblasts, an effect inhibited by the free ligand DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid).¹⁴ DaSilva et al recently reported that Omniscan induced human fibroblast proliferation and directly stimulated hyaluronan production. Furthermore, this GC was found to alter the matrix metalloproteinase-1/tissue inhibitor of metalloproteinases-1 system, which is responsible for regulating collagen turnover in the skin.⁵⁴ Moreover, another study from the same team demonstrated that Gd^{3+} induced the proliferation of human dermal fibroblasts, an effect modulated through the platelet-derived growth factor receptor-associated signaling pathway.⁵⁵

Like other lanthanides, Gd may also interfere with fibrillogenesis by attaching to the helical part of the collagen molecule.¹⁶ However, as indicated previously, the presence of insoluble Gd (in the form of phosphate or other salts) in the skin is very likely. It has been proposed that Gd phosphate may trigger pro-inflammatory events.^{6,11–13} Undoubtedly, additional studies are needed to elucidate the role of dissociated Gd in the pathophysiology of NSF.

In summary, our results are strongly indicative of gradual in vivo dechelation and release of dissociated Gd in a soluble form in renally impaired rats receiving the nonionic linear GC Omniscan, whereas the ionic macrocyclic GC Dotarem remained stable over the study period.

REFERENCES

- High WA, Ayers RA, Cowper SE. Gadolinium is quantifiable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:710–712.
- Boyd AS, Zic JA, Abraham JL. Gadolinium deposition in nephrogenic fibrosing dermatopathy. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:27–30.
- Abraham JL, Thakral C, Skov L, et al. Dermal inorganic gadolinium concentrations: evidence for in vivo transmetalation and long-term persistence in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol*. 2008;158:273–280.
- Wiginton CD, Kelly B, Oto A, et al. Gadolinium-based contrast exposure, nephrogenic systemic fibrosis, and gadolinium detection in tissue. *Am J Roentgenol*. 2008;190:1–9.
- Schroeder JA, Weingart C, Coras B, et al. Ultrastructural evidence of dermal gadolinium deposits in a patient with nephrogenic systemic fibrosis and end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:968–975.
- Thakral C, Abraham JL. Nephrogenic systemic fibrosis: histology and gadolinium detection. *Radiol Clin North Am*. 2009;47:841–853.
- High WA, Ranville JF, Brown M, et al. Gadolinium deposition in nephrogenic systemic fibrosis: an examination of tissue using synchrotron x-ray fluorescence spectroscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62:38–44.
- High WA, Ayers RA, Chandler J, et al. Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:21–26.
- Swaminathan S, High WA, Ranville J, et al. Cardiac and vascular metal deposition with high mortality in nephrogenic systemic fibrosis. *Kidney Int*. 2008;73:1413–1418.
- Idée JM, Port M, Medina C, et al. Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a critical review. *Toxicology*. 2008;248:77–88.
- Morcos SK. Nephrogenic systemic fibrosis following the administration of extracellular gadolinium-based contrast agents: is the stability of the contrast agent molecule an important factor in the pathogenesis of this condition? *Br J Radiol*. 2007;80:73–76.
- Perazella MA. Tissue deposition of gadolinium and development of NSF: a convergence of factors. *Semin Dial*. 2008;21:150–154.
- Steger-Hartmann T, Raschke M, Riefke B, et al. The involvement of pro-inflammatory cytokines in nephrogenic systemic fibrosis. A mechanistic hypothesis based on preclinical results from a rat model treated with gadodiamide. *Exp Toxicol Pathol*. 2009;61:537–552.
- Varani J, DaSilva M, Warner RL, et al. Effects of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents on human skin in organ culture and human skin fibroblasts. *Invest Radiol*. 2009;44:74–81.
- Fu LJ, Li JX, Yang XG, et al. Gadolinium-promoted cell cycle progression with enhanced S-phase entry via activation of both ERK and PI3K signaling pathways in NIH 3T3 cells. *J Biol Inorg Chem*. 2009;14:219–227.
- Stratta P, Canavesio C, Aime S. Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging, renal failure and nephrogenic systemic fibrosis/nephrogenic fibrosing dermatopathy. *Curr Med Chem*. 2008;15:1229–1235.
- Wermuth PJ, Del Galdo F, Jiménez SA. Induction of the expression of profibrotic cytokines and growth factors in normal human peripheral blood monocytes by gadolinium contrast agents. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1508–1518.
- Newton BB, Jiménez SA. Mechanism of NSF: new evidence challenging the prevailing theory. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:1277–1283.
- Port M, Idée JM, Medina C, et al. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biometals*. 2008;21:469–490.
- Idée JM, Port M, Dencausse A, et al. Involvement of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: an update. *Radiol Clin North Am*. 2009;47:855–869.
- Frenzel T, Lengsfeld P, Schirmer H, et al. Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37°C. *Invest Radiol*. 2008;73:817–828.
- Lauffer RB. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chem Rev*. 1987;87:901–927.
- Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, et al. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev*. 1999;99:2293–2352.
- Chamberlain RM, Shirley DG. Time course of the renal functional response to partial nephrectomy: measurements in conscious rats. *Exp Physiol*. 2007;92:251–262.
- Fleck C, Appenroth D, Jonas P, et al. Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6 NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats. Influence of strain, sex, and surgical procedure. *Exp Toxicol Pathol*. 2006;57:195–205.
- Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, et al. Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicol Pathol*. 2004;32:126–131.
- Pietsch H, Lengsfeld P, Steger-Hartmann T, et al. Impact of renal impairment on long-term retention of gadolinium in the rodent skin following the administration of gadolinium-based contrast agents. *Invest Radiol*. 2009;44:226–233.
- Grant D, Johnsen H, Juelsrud A, et al. Effects of gadolinium contrast agents in naïve and nephrectomized rats: relevance to nephrogenic systemic fibrosis. *Acta Radiol*. 2009;50:156–169.
- Haylor J, Dencausse A, Vickers M, et al. Nephrogenic gadolinium biodistribution and skin cellularity following a single injection of Omniscan in the rat. *Invest Radiol*. 2010;45:507–512.
- Ersoy H, Rybicki FJ. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26:1190–1197.
- US Food and Drugs Administration CfDEaR. Guidance for industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers; 2005:1–27. Available at: <http://www.fda.gov/>

- downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf. Accessed May 19, 2010.
32. Thomsen HS. Nephrogenic systemic fibrosis: history and epidemiology. *Radiol Clin North Am.* 2009;47:827–831.
 33. Abujudeh HH, Kaewlai R, Kagan A, et al. Nephrogenic systemic fibrosis after gadopentetate dimeglumine exposure: case series of 36 patients. *Radiology.* 2009;253:81–89.
 34. Broome DR. Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: a summary of the medical literature reporting. *Eur J Radiol.* 2008;66:230–234.
 35. Prince MR, Zhang H, Morris M, et al. Incidence of nephrogenic systemic fibrosis at two large medical centers. *Radiology.* 2008;248:807–816.
 36. Wertman R, Altun E, Martin DR, et al. Risk of nephrogenic systemic fibrosis: evaluation of gadolinium chelate contrast agents at four American universities. *Radiology.* 2008;248:799–806.
 37. Sieber MA, Pietsch H, Walter J, et al. A preclinical study to investigate the development of nephrogenic systemic fibrosis: a possible role for gadolinium-based contrast media. *Invest Radiol.* 2008;43:65–75.
 38. Sieber MA, Lengsfeld P, Frenzel T, et al. Preclinical investigation to compare different gadolinium-based contrast agents regarding the propensity to release gadolinium in vivo and to trigger nephrogenic systemic fibrosis-like lesions. *Eur Radiol.* 2008;18:2164–2173.
 39. Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, et al. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol.* 2005;40:715–724.
 40. Giesel FL, von Tengg-Kobligh H, Wilkinson ID, et al. Influence of human serum albumin on longitudinal transverse relaxation rates (R1 and R2) of magnetic resonance contrast agents. *Invest Radiol.* 2006;41:222–228.
 41. Stanis GJ, Henkelman RM. Gd-DTPA relaxivity depends on macromolecular content. *Magn Reson Med.* 2000;44:665–667.
 42. Port M, Corot C, Violas X, et al. How to compare the efficiency of albumin-bound and nonalbumin-bound contrast agents in vivo: the concept of dynamic relaxivity. *Invest Radiol.* 2005;40:565–573.
 43. Laurent S, Vander Elst L, Copoix F, et al. Stability of MRI paramagnetic contrast media. A proton relaxometric protocol for transmetallation assessment. *Invest Radiol.* 2001;36:115–122.
 44. Laurent S, Vander Elst L, Muller RN. Comparative study of the physico-chemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Media Mol Imaging.* 2006;1:128–137.
 45. Cabella C, Crich SG, Corpillo D, et al. Cellular labelling with Gd(III) chelates: only high thermodynamic stabilities prevent the cells acting as “sponges” of Gd³⁺ ions. *Contrast Media Mol Imaging.* 2006;1:23–29.
 46. Harrison A, Walker CA, Pereira KA, et al. Hepato-biliary and renal excretion in mice of charged and neutral gadolinium complexes of cyclic tetra-azaphosphinic and carboxylic acids. *Magn Reson Imaging.* 1993;11:761–770.
 47. Tweedle MF, Wedeking P, Kumar K. Biodistribution of radiolabeled, formulated gadopentetate, gadoteridol, gadoterate, and gadodiamide in mice and rats. *Invest Radiol.* 1995;30:372–380.
 48. Idée JM, Berthommier C, Goulas V, et al. Haemodynamic effects of macrocyclic and linear gadolinium chelates in rats: role of calcium and transmetallation. *Biometals.* 1998;11:113–123.
 49. White GW, Gibby WA, Tweedle MF. Comparison of Gd(DTPA-BMA) (Omniscan) versus Gd(HP-DO3A) (ProHance) relative to gadolinium retention in human bone tissue by inductively coupled mass spectroscopy. *Invest Radiol.* 2006;41:272–278.
 50. Thakral C, Abraham JL. Gadolinium-induced nephrogenic systemic fibrosis is associated with insoluble Gd deposits in tissues: in vivo transmetallation confirmed by microanalysis. *J Cutan Pathol.* 2009;36:1244–1254.
 51. George SJ, Webb SM, Abraham JL, et al. Synchrotron x-ray analyses demonstrate phosphate-bound gadolinium in skin in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol.* 2010;163:1077–1081.
 52. Evans CH. The occurrence and metabolism of lanthanides. In: *Biochemistry of the Lanthanides*. New York, NY: Plenum Press; 1990:285–337.
 53. Steger-Hartmann T, Hofmeister R, Ernst R, et al. A review of preclinical safety data for Magnevist (gadopentetate dimeglumine) in the context of nephrogenic systemic fibrosis. *Invest Radiol.* 2010;45:520–528.
 54. DaSilva M, Deming MO, Fligiel SE, et al. Responses of human skin in organ culture and human skin fibroblasts to a gadolinium-based MRI contrast agent: comparison of skin from patients with end-stage renal disease and skin from healthy subjects. *Invest Radiol.* 2010;45:733–739.
 55. Bhagavathula N, Dame MK, Dasilva M, et al. Fibroblast response to gadolinium: role for platelet-derived growth factor receptor. *Invest Radiol.* 2010;45:769–777.

5.2.2 Résultats et discussion

Une **forte morbi-mortalité**, la présence de **lésions cutanées macroscopiques**, des **lésions du collagène** ont été observées chez les rats ayant reçu le **gadodiamide non formulé**. De petites lésions histologiques ont été notées chez les rats du groupe gadodiamide : perte de la configuration des fibres de collagène, présence de fibres de collagène épaisses, condensées et coagulées.

Au sacrifice (soit 5 jours après la dernière administration), la **concentration cutanée de gadolinium** était **plus importante** chez les rats ayant reçu le **gadodiamide formulé** que chez ceux du groupe ayant reçu l'acide gadotérique. Cependant, l'analyse statistique n'a pas fait apparaître de différences significatives entre les groupes.

Chez le groupe traité par le gadodiamide formulé, la **concentration de Gd total dans le fémur** était significativement **supérieure** à celle mesurée dans le groupe ayant reçu le CG macrocyclique, l'acide gadotérique. Le faible nombre d'animaux ayant reçu le gadodiamide non formulé et ayant survécu jusqu'à la fin de l'étude (deux) n'a pas permis l'analyse statistique. Cette rétention du Gd supérieure avec le gadodiamide par rapport à un CG macrocyclique est cohérente avec les données de la littérature (Haylor et coll., 2012 ; Pietsch et coll., 2009a ; Sieber et coll., 2008b).

Dans le plasma, la concentration de gadolinium total a été équivalente pour les trois groupes, au jour du sacrifice. Cependant, le dosage du Gd^{3+} « libre » sur les mêmes échantillons a clairement fait apparaître une différence entre les traitements. En effet, la concentration de Gd^{3+} « libre » pour le groupe traité par l'acide gadotérique a été inférieure à la limite de détection, alors que **62 ± 15 %** du gadolinium total dosé à ce délai était **sous forme « libre »** chez les rats ayant reçu le **gadodiamide** ($1,4 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$ contre $2,3 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$ de Gd total). Ce résultat s'explique probablement par la plus faible stabilité thermodynamique et cinétique de ce CG (Port et coll., 2008). Chez les deux rats ayant reçu du gadodiamide non formulé, la concentration de Gd^{3+} « libre » ($1,08 \mu\text{mol/L}$) et le pourcentage de Gd^{3+} plasmatique libre (52 %) sont globalement similaires à ceux du gadodiamide. Cette comparaison doit cependant être nuancée par le faible nombre de survivants. Ce résultat est cohérent avec le fait que le ligand libre ajouté au gadodiamide complexe le Gd^{3+} libre dans le flacon mais n'a plus d'effet pharmacologique une fois injecté *in vivo*.

L'objectif essentiel de notre étude était de définir la **nature « libre » ou complexée** du gadolinium trouvé dans différents tissus (plasma, peau et os) de rats insuffisants rénaux, après administration de deux CGs, représentatifs de deux classes différentes en termes de stabilités thermodynamique et cinétique.

L'étude de la relaxivité permet de définir l'état libre ou complexé du gadolinium présent dans les tissus. En effet, selon sa forme, le gadolinium n'interagit pas de la même manière

avec les protons de l'eau extracellulaire. Lorsqu'il est sous forme libre et soluble, une augmentation de la valeur de r_1 est observée. Dans le groupe traité par l'acide gadotérique, les concentrations de gadolinium dans le fémur sont insuffisantes pour induire un effet détectable par relaxométrie (différence entre le rapport $1/T_1$ mesuré et celui du diamagnétique inférieure à 10 %, qui est la limite arbitraire fixée au laboratoire) pour 7 rats sur 8, ne permettant donc la mesure de la valeur de r_1 (que chez un seul animal (qui était comprise dans l'intervalle r_1 *in vitro*). Dans le cas du **gadodiamide**, au contraire, une **augmentation de la valeur de r_1 *in vivo*** par rapport à l'intervalle r_1 *in vitro* a été constatée, ce qui suggère fortement la décomplexation du complexe dans ce tissu, avec, donc, une **libération de Gd^{3+} soluble**.

La peau présente l'intérêt de permettre des mesures répétées et donc un suivi temporel de la relaxivité. Il apparaît clairement une **augmentation** de ce paramètre entre les deux délais étudiés pour le groupe gadodiamide contrairement au groupe ayant reçu l'acide gadotérique, ce qui, là aussi, suggère une **décomplexation *in vivo* du gadodiamide**.

Nos travaux montrent donc la **dissociation *in vivo* d'un CG linéaire et non ionique, le gadodiamide**, avec libération de **Gd^{3+} dissocié et soluble**, alors qu'un CG macrocyclique et ionique, l'acide gadotérique, reste stable, quelle que soit la méthode utilisée. Notre méthode d'évaluation par relaxométrie semble très intéressante pour l'étude de la dissociation *in vivo* des CGs dans des échantillons solides inaccessibles aux méthodes spectrométriques.

Par ailleurs, la rétention intratissulaire de Gd et les lésions des fibres de collagène sont également plus importantes dans le groupe ayant reçu du gadodiamide qu'aux lésions minimales notées dans les groupes témoin et ayant reçu l'acide gadotérique. Par conséquent, la structure moléculaire des CGs semble donc jouer un rôle important sur la stabilité de l'agent *in vivo*. Différentes études *in vitro* ont montré les effets profibrosants du Gd^{3+} « libre », qu'il soit soluble (Bleavins et coll., 2012) ou insoluble (Li et coll. 2010 ; Bhagavathula et coll. 2010 ; Varani et coll., 2009).

Néanmoins, il nous semble prématuré de conclure à un lien causal direct entre la présence de Gd^{3+} dissocié et soluble et la pathologie, sur la base de nos seuls résultats.

Chapitre 6 : EFFETS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES DES COMPLEXES DE GADOLINIUM *IN VIVO*

6.1 Modèle d'insuffisance rénale par néphrectomie des 5/6^e (Article 2)

6.1.1 Rationnelle

Il est essentiel de **mettre au point un modèle de FSN *in vivo***, sensibilisé, afin de mieux comprendre le mécanisme de cette pathologie très invalidante.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, tous les patients souffrants de FSN sont insuffisants rénaux, ce qui se traduit par une augmentation de l'exposition à la molécule. Certaines équipes ont choisi d'injecter de fortes (jusqu'à 5,0 mmol/kg) et/ou de multiples doses (20 administrations) de CGs chez des rats dits « naïfs » (c'est-à-dire, non insuffisants rénaux) afin de mimer une exposition prolongée à la molécule (Sieber et coll., 2008a et 2008b). Pour être plus proche de la clinique humaine, il nous a semblé essentiel d'utiliser des rats insuffisants rénaux. De plus, lors de l'injection de l'agent de contraste, nous avons souhaité en évaluer les effets sur la fonction rénale.

Comme dans l'étude précédente, nous avons choisi de comparer **deux catégories moléculaires de CGs** qui diffèrent fortement par leurs stabilités thermodynamique et cinétique chez des rats néphrectomisés des 5/6^e. Le protocole d'administration des CGs est celui décrit par Pietsch et coll. (2009) (soit 5 injections intraveineuses, à raison d'une fois par jour pendant 5 jours consécutifs à une dose de 2,5 mmol/kg) et est similaire à celui de notre étude de dissociation des CGs *in vivo* (Fretellier et coll., 2011b).

Les objectifs de notre étude ont donc été :

- 1). dans une étude préliminaire, de caractériser le modèle de néphrectomie des 5/6^e par un suivi temporel de la fonction rénale et des paramètres hématologiques et biochimiques.
- 2). dans un deuxième temps, de comparer les effets toxicologiques (clinique, histopathologie, biochimie, hématologie) d'un CG linéaire non ionique, le gadodiamide, d'un macrocycle ionique, l'acide gadotérique, ainsi que du gadodiamide non formulé. L'étude a été réalisée en 2 étapes : sur un modèle dit « à court terme » où les animaux ont été euthanasiés à J11 (c'est-à-dire 5 jours après la dernière administration) et par la suite, sur un modèle dit « à long terme » pour lequel les rats ont été euthanasiés plus tardivement (J32).

Ce travail a donné lieu à la publication suivante (article 2) :

Fretellier N, Idée JM, Guerret S, Hollenbeck C, Hartmann D, González W, Robic C, Port M, Corot C. Clinical, biological, and skin histopathologic effects of ionic macrocyclic and nonionic linear gadolinium chelates in a rat model of nephrogenic systemic fibrosis. *Invest Radiol.* 2011a; 46: 85-93.

Clinical, Biological, and Skin Histopathologic Effects of Ionic Macrocytic and Nonionic Linear Gadolinium Chelates in a Rat Model of Nephrogenic Systemic Fibrosis

Nathalie Fretellier, MS,* Jean-Marc Idée, PharmD,* Sylviane Guerret, PhD,† Claire Hollenbeck, BS,* Daniel Hartmann, PharmD,‡ Walter González, PhD,* Caroline Robic, PhD,* Marc Port, PhD,* and Claire Corot, PharmD*

Objective: The purpose of this study was to compare the clinical, pathologic, and biochemical effects of repeated administrations of ionic macrocytic or nonionic linear gadolinium chelates (GC) in rats with impaired renal function.

Material and Methods: Rats submitted to subtotal nephrectomy were allocated to single injections of 2.5 mmol/kg of gadodiamide (nonionic linear chelate), nonformulated gadodiamide (ie, without the free ligand caldiamide), gadoterate (ionic macrocytic chelate), or saline for 5 consecutive days. Blinded semi-quantitative histopathologic and immunohistochemical examinations of the skin were performed, as well as clinical, hematological, and biochemical follow-up. Rats were killed at day 11. Long-term (up to day 32) follow-up of rats was also performed in an auxiliary study.

Results: Epidermal lesions (ulcerations and scabs) were found in 4 of the 10 rats treated with nonformulated gadodiamide. Two rats survived the study period. Inflammatory signs were observed in this group. No clinical, hematological, or biochemical signs were observed in the saline and gadoterate- or gadodiamide-treated groups. Plasma fibroblast growth factor-23 levels were significantly higher in the gadodiamide group than in the gadoterate group (day 11). Decreased plasma transferrin-bound iron levels were measured in the nonformulated gadodiamide group. Histologic lesions were in the range: nonformulated gadodiamide (superficial epidermal lesions, inflammation, necrosis, and increased cellularity in papillary dermis) > gadodiamide (small superficial epidermal lesions and signs of degradation of collagen fibers in the dermis) > gadoterate (very few pathologic lesions, similar to control rats).

Conclusions: Repeated administration of the nonionic linear GC gadodiamide to renally impaired rats is associated with more severe histologic lesions and higher FGF-23 plasma levels than the macrocytic GC gadoterate.

Key Words: nephrogenic systemic fibrosis, gadolinium chelates, gadodiamide, gadoterate, renal impairment, fibroblast growth factor-23

(*Invest Radiol* 2011;46: 85–93)

Nephrogenic systemic fibrosis (NSF) is a scleroderma-like disease comprising extensive thickening and hardening of the skin associated with skin-colored to erythematous papules that coalesce into erythematous to brawny plaques with a peau d'orange appearance, always occurring in patients with severe or end-stage renal failure. Nodules are sometimes also described. Joint contractures

may develop, with some patients progressively becoming wheelchair-dependent. Patients often complain of pruritus, causalgia, and sharp pains. The distal extremities are the most common site of involvement, followed by the trunk.^{1,2}

A link between the administration of gadolinium chelates (GC) for magnetic resonance imaging procedure and the development of NSF is now generally accepted.³

Basically, 2 structurally distinct categories of GC are currently marketed: (a) “macrocytic” chelates (gadoterate, gadoteridol, or gadobutrol) in which the Gd³⁺ ion is “caged” in the preorganized cavity of the ligand, and (b) “linear” (or “open chain”) chelates (gadopentetate, gadobenate, gadodiamide, gadoversetamide, gadofosveset, and gadoxetate). GC can also be either “nonionic” (in which the number of carboxyl groups is reduced to 3, neutralizing the 3 positive charges of Gd³⁺) or “ionic” (where the remaining carboxyl groups are salified with meglumine or sodium).⁴ GC differ in terms of the molecular stability of their solutions. High kinetic stability provided by the macrocytic structure combined with high thermodynamic stability minimizes the amount of free Gd³⁺ that can be gradually released from the parent chelate.⁴ To reduce the risk of gradual Gd³⁺ release in the pharmaceutical solution during shelf-life, several GC, especially low stability GC such as gadodiamide, are formulated with a free ligand.⁴

To date, the majority of cases of NSF reported in the literature have been associated with administration of the nonionic, linear GC gadodiamide,⁵ although several reports have also concerned other GC, notably the ionic linear gadopentetate and the nonionic linear GC gadoversetamide.^{6–9} No unconfounded case report involving the ionic macrocytic GC gadoterate has been published so far. Despite of active research, the mechanism of NSF has not, as yet, been definitely determined.¹⁰ Several authors have suggested that in vivo dechelation of GC may trigger profibrotic pathways, in the presence of risk factors,^{11,12} thus underscoring the importance of the thermodynamic and kinetic stabilities. However, on the basis of in vitro data, the pathophysiologic relevance of these physicochemical characteristics in NSF has been disputed.¹³

Selection of appropriate animal models is an important challenge not only to provide a better understanding of the mechanism of the disease, but also to allow early screening of candidate GC under preclinical development. As severe chronic kidney disease is the most obvious factor associated with NSF, it seemed appropriate to investigate rats with impaired renal function. Subtotal (5/6) nephrectomy has been shown to delay clearance of GC in rats, an effect associated with a higher concentration of gadolinium in the skin of rats that received the nonionic linear GC gadodiamide and gadoversetamide when compared with the ionic linear GC gadopentetate. The lowest values were found in rats treated with a macrocytic GC (gadobutrol).¹⁴

The aim of the present study was to compare an ionic, macrocytic GC (gadoterate) (high thermodynamic and kinetic sta-

Received May 20, 2010; accepted for publication, after revision, July 10, 2010. From the *Guerbet, Research Division, Aulnay-Sous-Bois, France; †Novotec, Lyon, France; and ‡School of Pharmacy, USPS 2007.03.135, University Claude Bernard Lyon I, Lyon, France.

Reprints: Jean-Marc Idée, PharmD, MS, Research Division, BP 57400, 95943 Roissy Charles de Gaulle Cedex, France. E-mail: jean-marc.idee@guerbet-group.com.

Copyright © 2011 by Lippincott Williams & Wilkins
ISSN: 0020-9996/11/4602-0085

bilities) with the nonionic, linear GC gadodiamide (low thermodynamic and kinetic stabilities), the latter both formulated and nonformulated with free ligand caldiumide, with respect to their clinical, histopathologic (both short- and long-term), biochemical, and hematological effects, in rats with impaired renal function.

MATERIALS AND METHODS

Animal Model

All studies were carried out on male, Wistar rats from CERJ (Centre d'Élevage René Janvier, Le Genest Saint-Isle, France), aged 6 weeks and weighing 235 ± 23 g.

The animals underwent subtotal (5/6) nephrectomy (SNx): the right kidney was exposed through a flank incision, the adrenal gland was separated from the upper pole, and the kidney was decapsulated. The renal pedicle was ligated and the right kidney was removed. Subsequently, the left kidney was decapsulated and the adrenal gland was separated from the upper pole. Ligatures were placed around the upper and lower poles and the poles were excised. Animals were anesthetized with ketamine and xylazine. An intravenous injection of 1.0 mL/kg of saline was performed on completion of surgery to compensate for blood loss. The surgical procedure was carried out at the CERJ laboratory.

The animals were housed 1 per cage at an ambient temperature of $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, hygrometry of $55\% \pm 10\%$, with 12/12 light/dark cycles. Animals had free access to water and standard animal chow (reference A04, SAFE, Augy, France) containing (per kilogram) 5.9 g phosphorus, 8.3 g calcium, 2.5 g sodium, 6.7 g potassium, 2 g magnesium, 85 mg zinc, and 240 mg iron. The protein concentration was 16.1%.

All experimental procedures were carried out according to French rules and in compliance with the European Economic Community Directive (86/609/EC) on animal welfare. The protocol was approved by the local ethics committee.

Comparative Gadoterate Versus Gadodiamide Study

Thirty-three male, Wistar subnephrectomized rats from CERJ, aged 6 weeks and weighing 232 ± 26 g were allocated to a daily treatment with either saline (5.0 mL/kg), 0.5 M meglumine gadoterate (Dotarem, Guerbet, Villepinte, France, batch 8GD051B), 0.5 M gadodiamide (Omniscan, GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom batch 10758384), or nonformulated gadodiamide (ie, without the 25 mM excess ligand caldiumide present in the commercial solution of gadodiamide) (0.495 M, synthesized at the Guerbet Research Department). The rats received saline or 2.5 mmol/kg of each GC intravenously via the tail vein at a rate of 1.0 mL/min, daily for 5 consecutive days, starting 10 days after subtotal nephrectomy. This period was defined after a preliminary study where 10 SNx rats were compared with 4 control, sham-operated animals. The creatinine clearance of the SNx rats was found to be significantly decreased (-66%) from the first measurement (day 7) when compared with sham-operated rats ($P < 0.05$). The creatinine clearance remained stable in the SNx group all over the study ($0.38\text{--}0.48$ mL/min/100 g). Creatinine clearance was 1.0 to 1.2 mL/min/100 g in the sham-operated control group.

The rats were killed (exsanguinations under isoflurane anesthesia) 11 days after the first administration.

All injections and blood samples were performed under isoflurane/oxygen (3.5% induction, then 2.5%, 1 L/min oxygen) anesthesia.

Biochemistry and Hematology

Hematology (erythrocyte, leukocyte and platelet counts, hematocrit, hemoglobin concentration) was studied using a MS4 au-

tomat (Melet-Schloesing, Osny, France). The blood levels of total calcium, phosphorus, transferrin-bound iron, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine (Vitros-II auto-analyzer), sodium, chloride, and potassium (direct potentiometry, Vitros-350 autoanalyzer, OrthoClinical Diagnostics Inc, Issy-les-Moulineaux, France) were also measured. The biologic parameters were measured on days 0, 3, 9, and 11. Blood samples were taken from the sublingual vein.¹⁵ All assays were performed in duplicate.

In addition, the C-reactive protein levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (United States Biologic, Swampscott, MA) before the first injection and on day 3. Plasma levels of the cytokines interleukin-1- β (IL1- β), monocytes chemotactic protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor- α (TNF α), and transforming growth factor β 1 (TGF β ₁) were measured by ELISA (Bender MedSystems, Vienna, Austria) on days 3 and 9. Plasma levels of fibroblast growth factor 23 (FGF-23) at day 11 were measured by ELISA (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan). The FGF-23 levels of subtotal nephrectomized rats receiving a high phosphate diet (1.0%) and sham-operated rats receiving a normal diet were also measured at day 35 postsurgery (plasma phosphorus levels 3.9 (n = 2) and 2.3 ± 0.4 mmol/L, respectively).

Macroscopic Skin Findings and Histology

The rats were checked for macroscopic skin changes before the first injection and then daily throughout the study. On day 4, the back of the animals were shaved for better visualization of potential lesions. The backs and abdomens were shaved again at completion of the study. Skin samples (2 cm²) were taken from the backs of animals (normal skin and lesions). The skin samples were fixed in 4% neutral buffered formalin. After routine dehydration, the samples were embedded in paraffin, sectioned (5 μm thickness) for hematoxylin-eosin-saffron for topographical analysis, picosirius red to detect the presence of collagen, and Alcian blue for acidic mucopolysaccharides. Immunohistochemical staining was performed to detect CD34 (cluster of differentiation 34) and TGF β ₁ positive cells using anti-CD34 goat antibody (diluted to 1:1000, R&D Systems, Minneapolis, MN) and anti-TGF β ₁ rabbit antibody (diluted to 1:250, GeneTex, San Antonio, TX) using ImmPRESS polymerized reporter peroxidase staining (ImmPRESS anti-goat Ig (peroxidase) kit (MP 7405) and ImmPRESS anti-rabbit Ig (peroxidase) kit (MP 7401), respectively (Vector Laboratories Burlingame, CA).

Histopathologic examinations were performed in a blinded manner by a certified histopathologist (S.G.) in accordance with the guidelines of the Society of Toxicologic Pathology.¹⁶

Pathologic lesions, especially the distribution of thin or thick collagen fibers in the extracellular matrix (ECM) and CD34 and TGF β ₁ positive cells, were evaluated semi-qualitatively using a 5-point severity grading scale ranging from 0 (absent) to +++ (very severe) for each animal. In the long-term study, the expression of CD34 and TGF β ₁ was investigated by calculating, for each rat, the percentage of positive cells per field (5 fields/rat) at day 4 and 32.

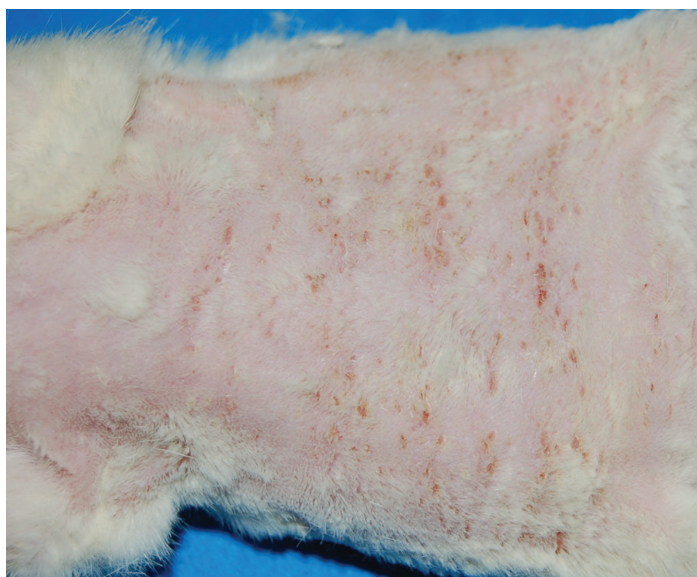
Long-Term Study

To investigate possible long-term histopathologic effects, 10 male Wistar rats, from CERJ, aged 6 weeks and weighing 222 ± 17 g, were injected intravenously with 5 consecutive once-daily doses of saline (2 rats) or 2.5 mmol Gd/kg bodyweight of gadoterate (4 rats) and gadodiamide (4 rats), starting 10 days after subtotal nephrectomy.

Skin biopsies were performed at day 4, 11, 18, and 25 after first injection, under isoflurane/oxygen anesthesia with a biopsy

TABLE 1. Observed Macroscopic Skin Lesions and Other Clinical Symptoms After Treatment With Gadoterate, Gadodiamide, Nonformulated Gadodiamide (5×2.5 mmol/kg Daily), or Saline (5×5.0 mL/kg Daily)

Compounds	No. Rats per Group	No. Rats Alive at Completion of the Study (Day 11)	No. Rats With Skin Lesions	Other Symptoms
Saline	7	7	0	—
Gadoterate (Dotarem)	8	8	0	—
Gadodiamide (Omniscan)	8	8	0	—
Nonformulated gadodiamide	10	2 (5 rats euthanized for ethical reasons and 3 rats found dead [day 3, 7, and 9])	4 (starting at day 5) (scab formation and ulceration)	Prostration, piloerection, loss of bodyweight

**FIGURE 1.** Typical abdominal skin lesions of a rat treated with nonformulated gadodiamide (day 9).

punch (6-mm diameter, Labonord, Templemars, France) and the wounds were then sutured. The sample was fixed in 4% neutral buffered formalin for histology.

The rats were necropsied (exsanguination under isoflurane anesthesia) 32 days after the first administration.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) or SAS (Statistical Analysis Software, Cary, NC). For each study, the homogeneity between groups was verified by analysis of variance. The effects of the test-solutions on bodyweight, biochemical, and hematological parameters were compared by analysis of variance with repeated measures with calculation of the time \times product interaction.¹⁷ A $P \leq 0.05$ was considered to indicate a significant difference.

RESULTS

Comparative Gadoterate Versus Gadodiamide Study (Short-Term Study)

Macroscopic and Microscopic Findings

Clinical data are shown in Table 1. Skin lesions (ulcerations and scabs) were found in 4 of the 10 rats treated with nonformulated gadodiamide in the neck, back, and abdominal skin, observed for the first time on day 5 (ie, after the first

injection) for 2 rats and day 9 for 2 rats (Fig. 1). Eight rats were either found dead or had to be killed for ethical reasons because of the severity of the skin lesions and loss of bodyweight. No scratching was observed.

No macroscopic skin lesions were observed in the rats treated with saline, gadoterate, or gadodiamide. No significant difference in bodyweight changes was observed between these groups. However, the 2 surviving rats treated with nonformulated gadodiamide experienced a loss in body weight (mean values: day 1: 287.8 g, day 11: 270.6 g).

Semi-quantitative histopathologic data are shown in Table 2, and typical lesions are illustrated in Figure 2. Very few histopathologic lesions were reported in the gadoterate-treated group or in the saline controls. The dermis presented constant thickness and low cellularity. ECM was dense underneath the epidermis and homogenous in the dermis (saline) and was homogenous in the gadoterate group. Small superficial epidermal lesions and degradation of collagen fibers in the dermis with disorganization of the ECM were observed in the gadodiamide group. The ECM was dense underneath the epidermis and looser in the deep dermis. Numerous superficial epidermal lesions, inflammation, necrosis, and increased in cellularity, as well as large areas of complete degradation of the ECM in the dermis were observed in the nonformulated gadodiamide group. CD34 or TGF β_1 positive immunolabeling was observed on spindle-shaped cells (fibroblast-like) and dendrocytes in the dermis. However, the dermal distribution of positive CD34 and TGF β_1 cells was heterogeneous.

Biochemistry and Hematology

No significant differences were observed between groups for plasma levels of sodium, potassium, chloride, ALT, and AST levels. Plasma phosphorus levels were decreased in gadodiamide-treated rats compared with controls at day 9 (1.6 ± 0.2 mmol/L and 2.2 ± 0.3 mmol/L, respectively, $P < 0.001$) and day 11 (1.6 ± 0.2 mmol/L and 2.0 ± 0.2 mmol/L, respectively, $P < 0.05$). At day 9, the plasma phosphorus level was also significantly lower in the gadodiamide group than that in the gadoterate group (1.6 ± 0.2 mmol/L vs. 2.0 ± 0.2 mmol/L, respectively, $P < 0.05$). A decrease in plasma iron levels was observed in the group receiving nonformulated gadodiamide (day 0: 58.6 ± 16.2 μ mol/L [$n = 10$ rats], day 11: 28.1 μ mol/L [$n = 2$ rats]) while no changes were observed in the other groups.

No changes in hematology parameters were observed, apart from a dramatic increase in the leukocyte count in the nonformulated gadodiamide group (at day 0: $24.1 \pm 1.9 \times 10^3$ cells/mm³, at day 11: 57.2×10^3 cells/mm³). The differential white cell count was granulocytes: $42.4\% \pm 1.7\%$, lymphocytes: $53.1\% \pm 1.7\%$, and monocytes: $4.5\% \pm 0.2\%$ on day 0; and granulocytes: 71.3% , lymphocytes: 26.3% , and monocytes: 2.5% on day 11 (2 rats).

TABLE 2. Semiquantitative Histopathologic Lesions

	Epidermis			Dermis										
	Local Lesion	Necrosis	Cellularity	Inflammation	Necrosis	Fibroblasts	Mast Cells	Dendrocytes	Thin Fibres ECM	Thick Fibres ECM	Wide Clefts	Mucus	TGFβ ₁	CD34
Saline	7 (-)7	(-)7	(+)6 (++)1	(-)7	(-)7	(+)7	(±)4 (+)3	(±)2 (+)5	(++)5 (+++) ²	(±)1 (+)6	(±)2 (+)5	(-)3 (±)1 (+)3	(+)2 (++)5 (+++) ¹	(+)1 (++)5 (+++) ¹
Gadoterate	8 (-)7 (±)1	(-)7 (±)1	(+)8	(-)7 (+)1	(-)8	(±)3 (+)5	(+)6 (++)2	(+)8	(+)6 (++)2	(±)2 (+)6	(+)6 (++)2	(-)2 (±)5 (+)1	(+)5 (++)3 (+++) ¹	(+)2 (++)5 (+++) ¹
Gadodiamide	8 (-)6 (±)2	(-)8	(+)8	(-)6 (+)2	(-)8	(+)8	(+)7 (++)1	(+)8	(++)8	(+)2 (++)6	(+)7 (++)1	(±)5 (+)2 (++)1	(+)5 (++)3 (+++) ¹	(+)2 (++)6
Nonformulated Gadodiamide	2 (++)2	(++)2	(++)2	(++)2	(++)2	(±)2	(+)2	(+)2	(+)2	(++)2	(+)2	(±)1 (+)1	(++)2	(+)2

- indicates absence; ±, mild; +, moderate; ++, severe; +++, very severe.

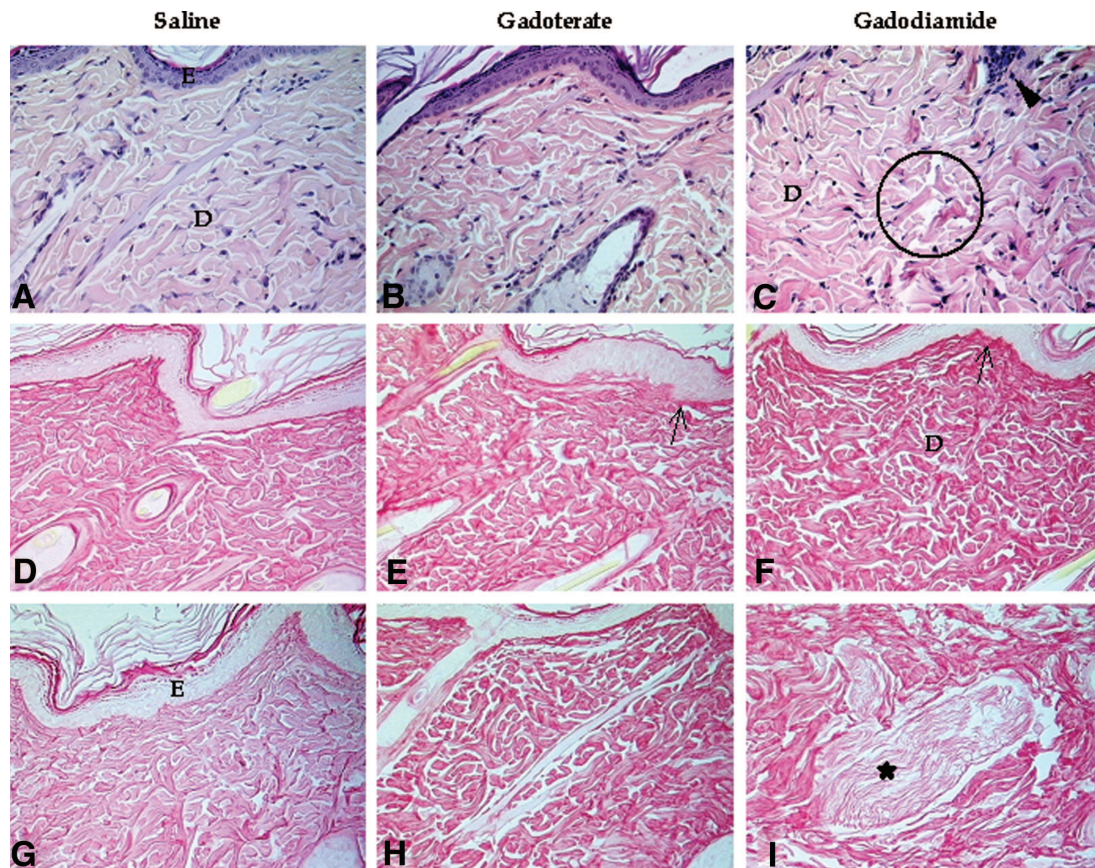


FIGURE 2. Histologic skin lesions in treated, renally impaired rats: short-term study. Hematoxylin and eosin staining (A–C) to analyze cellular lesions and picrosirius red staining (D–I) to detect ECM modifications (×20 magnification). After saline treatment (A, D, G): epidermis (E) thickness was constant; the dermis (D) was weakly cellular, and the ECM was homogeneous. After gadoterate treatment (B, E, H): several zones of epidermis were sometimes thickened; in the dermis only the ECM was slightly modified, showing slight condensation (→) under the dermoepidermal junction. Gadodiamide treatment (C, F, I) induced local epidermal necrosis and some inflammatory cells (▶) in the papillary dermis (or superficial); ECM was heterogeneous, showing small clusters of merged collagen fibers (○) or locally dissociated collagen fibers (★).

No significant variation of plasma C-reactive protein was observed between test groups at day 3 (data not shown).

Plasma IL1-β levels were significantly higher ($P < 0.01$) in the nonformulated gadodiamide group than in the saline, gadoterate, and gadodiamide groups at day 3 ($n = 8$ rats). At day

9 ($n = 4$ rats), plasma IL1-β levels were significantly higher ($P < 0.05$) in this group than in the gadodiamide group (Fig. 3A). A significant increase in plasma MCP-1 levels was also observed in the group receiving nonformulated gadodiamide, both during the injection period (day 3; $P < 0.001$) and at day 9 ($P < 0.001$) (Fig. 3B). No effect

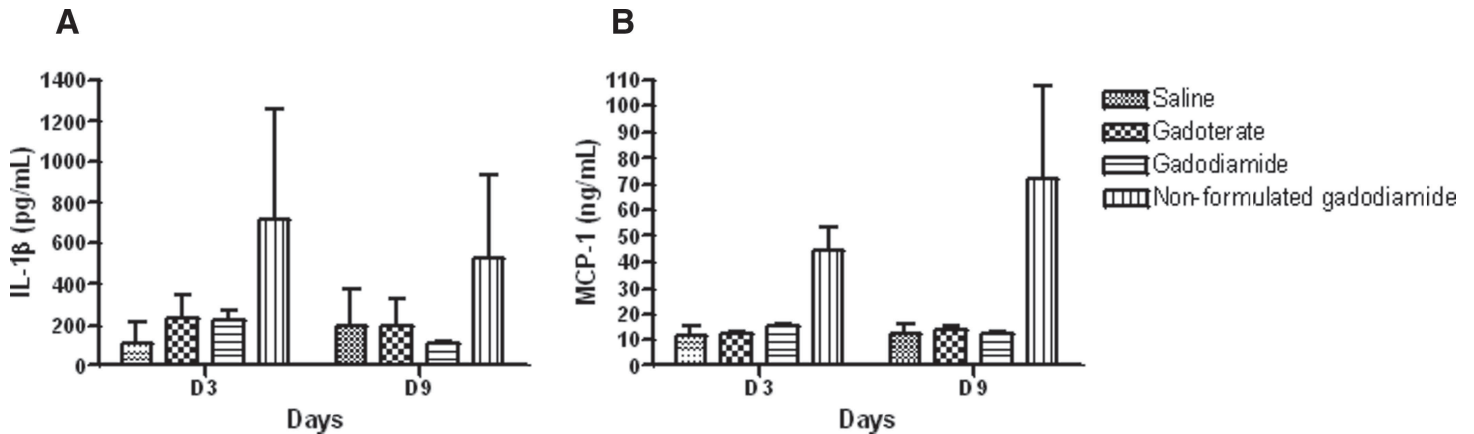


FIGURE 3. A, Plasma IL-1 β levels in subtotal (5/6) nephrectomized rats at day 3 (during injection period) and day 9. B, Plasma MCP-1 levels in subtotal (5/6) nephrectomized rats at day 3 (during injection period) and day 9. The rats were intravenously injected on 5 consecutive days with 2.5 mmol/kg/d.

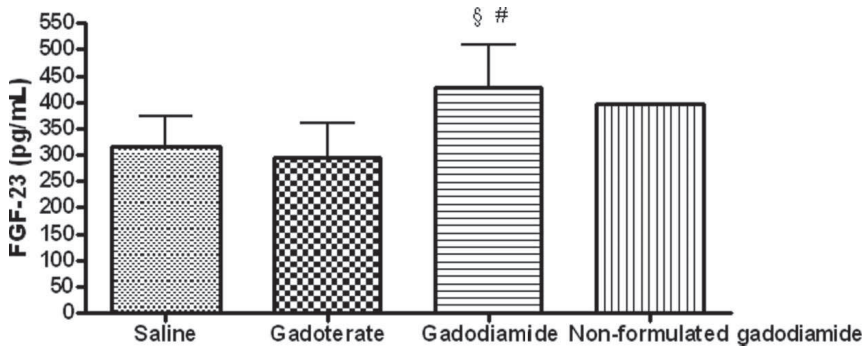


FIGURE 4. Plasma FGF-23 levels in subtotal (5/6) nephrectomized rats at day 11 (killed). The rats were intravenously injected on 5 consecutive days with 2.5 mmol/kg/d. [§] $P < 0.05$ versus saline, [#] $P < 0.01$ versus gadoterate.

TABLE 3. Histopathologic Lesions of the Dorsal Skin Observed in the Long-Term Study

Treatment	No. Rats	Histopathological Lesions on Rat Dorsal Skin at	
		Day 4	Day 32
Saline	2	N = 2	SN = 2
Gadoterate	4	N = 3, SN = 1	SN = 4
Gadodiamide	4	N = 1, SN = 2, + = 1	\pm = 1, + = 3

N indicates normal; SN, subnormal (rare, small areas of altered sub-epidermal dermis, minimal inflammatory reaction); \pm , locally thickened epithelium associated with several isolated necrotic cells, heterogeneous dermal matrix (presence of both dense and loose collagen bundles); +, locally thickened epithelium associated with some macrophage foci and small inflammatory foci, small clusters of damaged collagen bundles.

of the test compounds was observed on TGF β_1 and TNF α plasma levels, regardless of treatment and time-point (data not shown).

Higher FGF-23 levels were found in SNx rats receiving a high-phosphate diet (1370 pg/mL, n = 2) compared with sham-operated rats (235 \pm 91 pg/mL, n = 6). Plasma FGF-23 levels were higher in the gadodiamide treated group than in the saline ($P < 0.05$) and gadoterate groups ($P < 0.01$) (Fig. 4).

Comparative Gadoterate Versus Gadodiamide Study (Long-Term Study)

No macroscopic skin lesions were found in the rats treated with saline, gadoterate, or gadodiamide. No difference in body-weight changes was observed between groups (data not shown).

The histologic lesions found at day 4 and 32 are summarized in Table 3 and typical lesions are illustrated in Figure 5. More lesions were found on day 32 than on day 4 and more lesions were found in the gadodiamide-treated group than in the gadoterate-treated group. In particular, locally thickened epithelium associated with some inflammatory foci and small clusters of damaged collagen bundles were found in 3 of 4 gadodiamide-treated rats.

Neither gadoterate nor gadodiamide had any effect on TGF β_1 or CD34 immunostaining compared with the control group, regardless the time-point considered. Intense staining was observed at both time-points in the control group, especially for CD34 (Table 4).

DISCUSSION

Despite active research, the mechanism of NSF remains debated as the animal model must be adapted to ensure optimal clinical relevance. To achieve this objective, this study was conducted in subtotally nephrectomized rats; therefore, presenting significantly reduced renal function. The SNx rat model used in this study is similar to that selected by other teams.^{14,18,19} At 2.5 mmol/kg, the dose of GC used in rats was considerably higher, per unit bodyweight, than the dose range of 0.1 to 0.3 mmol/kg, classically used for magnetic resonance imaging contrast procedures in patients.²⁰ However, this dose was considered to be appropriate for chronic studies in rats for 2 reasons: first, comparative drug doses between species should be normalized to body surface area rather than body weight. The Food and Drug Administration recommends the use of a 6-fold increase to obtain a human equivalent drug dose for rats.²¹ On this basis, a dose of 0.4 mmol/kg GC in man, would be equivalent to 2.5 mmol/kg in rats. Second, the excretion half-life of GC in rats (around 20 minutes^{14,22}) is markedly shorter than in

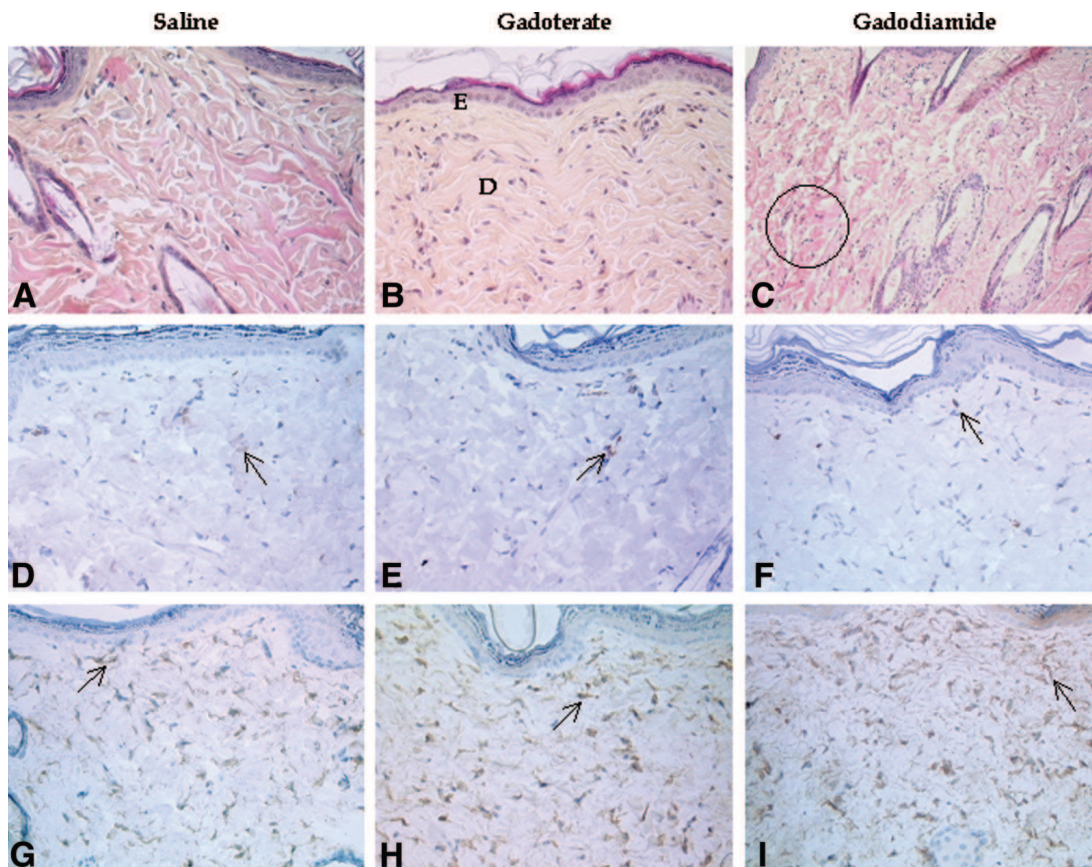


FIGURE 5. Histologic skin lesions in treated, renally impaired rats: long-term study (×20 magnification). The long-term study mainly showed changes of the ECM. Hematoxylin and eosin staining (A–C) showed some clusters of damaged collagen bundles (circled) regardless of the treatment. TGFβ1 (D–F) detection in papillary dermis was similar in the 3 groups and was only observed in some fibroblasts and dendritic cells; note the increased number of these TGFβ1 positive cells (→) in the reticular dermis. Anti-CD34 immunolabeling revealed a general tendency toward more positive cells (fibroblast-like) in the papillary dermis. The cellular CD34⁺ (→) staining was weak in saline and gadoterate-treated rats, (G, H) and increased in gadodiamide-treated rats (I).

TABLE 4. Percentage of CD34⁺ and TGFβ₁⁺ Cells (Mean of 5 Fields/Rat) at Day 4 at Day 32 (Long-Term Study)

Treatment	No. Rats	% of Cells Positive for			
		CD34		TGFβ ₁	
		Day 4	Day 32	Day 4	Day 32
Saline	2	76.0	54.3	18.9	16.7
Gadoterate	4	55.0	63.8	19.8	14.5
Gadodiamide	4	53.4	64.2	23.3	14.6

man (1.2–2 hours²³), reducing its tissue exposure and supporting the use of larger doses of GC in rats when calculated per unit body weight. The mean excretion half-life of gadodiamide (2.5 mmol/kg, single injection) in SNx rats was 58.7 ± 13.3 minutes versus 19.9 ± 2.3 minutes in non-SNx rats.¹⁴

In a preliminary study, the creatinine clearance of SNx rats remained stable throughout the observation period, for 61 days after surgery, and was reduced by around 60% compared with sham-operated rats. On the basis of this result, the injection time for the comparative study was defined as the 10th day after surgery.

Macroscopic skin lesions were detected in 4 of the 10 rats that received nonformulated gadodiamide. A high mortality, associated

with inflammatory signs and skin lesions, was observed in this group. This result is consistent with the results of other studies in rats with normal or impaired renal function.^{18,24} Because of its low intrinsic stability, the commercial solution of gadodiamide contains 25 mmol/L of caldiumide to chelate gadolinium that may be released during shelf-life.²³ Therefore, it is likely that dissociated gadolinium released in the vial during shelf-life of the test-solution triggered the systemic toxicity observed in this study. It has been suggested¹⁸ that excessive scratching caused by pruritus may cause the skin lesions induced by gadodiamide. It is noteworthy that, under the present study conditions, no scratching was observed, despite the treatment. Furthermore, in contrast with another study,¹⁸ no increase in dermal mast cells was observed in gadodiamide-treated rats compared with rats treated with gadoterate (Table 2).

Visible skin lesions following administration of formulated or nonformulated gadodiamide have been reported in several studies,^{18,24} including the 21-day subchronic toxicity study of the formulated solution in rats.²⁵ It has been suggested that this effect could be the consequence of caldiumide-induced zinc deficiency.²³ Bullous pustular dermatitis, alopecia, rough skin, hypogonadism, and oligospermia have been reported in patients with zinc deficiency.²⁶ However, this hypothesis is challenged by the fact that (a) a similar effect was observed in rats receiving nonformulated gadodiamide, as in our study,^{18,24} (b) no reduction in zinc concentrations was detected in gadodiamide-treated rats,¹⁷ and (c) coadministration

or zinc depletion does not protect rats against gadodiamide-induced skin lesions.²⁷ Furthermore, the thermodynamic stability constants are not in favor of a transmetallation phenomenon between zinc and gadolinium ($\log K_{\text{therm}}$ of Zn-DTPA-BMA = 12.0 and $\log K_{\text{therm}}$ of Gd-DTPA-BMA = 16.9).²⁸ Changes in zinc homeostasis following administration of high doses of gadodiamide are therefore unlikely to cause skin ulcerations. In contrast, a link has been reported between high gadolinium concentration in the skin and histologic skin lesions.¹⁴

The clinical relevance of histologic data from rat studies remains a debated topic.^{18,23,29,30} As underlined by Sieber et al,²⁹ differences in the anatomic structure of the skin in humans and rats may make the clinical relevance of preclinical studies somewhat hazardous. Furthermore, not all pathologic features of human NSF have been investigated in rat studies.²³ Finally, microscopic dermal abnormalities could be considered to be more clinically relevant than macroscopic epidermal lesions.

Very few histopathologic lesions were observed in the gadoterate group whereas degradation of collagen fibers was observed in the dermis of gadodiamide-treated rats (greater number of rats with thick, disorganized fibers) but no macroscopic epidermal lesions were observed (Tables 1 and 2). This effect was confirmed in the long-term study in which time-dependent inflammatory foci and damaged collagen bundles were observed in the gadodiamide group but not in the gadoterate group (more lesions at day 32 than at day 4). It has been speculated that soluble gadolinium released from less stable GC may bind to collagen molecules, interfering with fibrillogenesis.³¹ Recent studies have clearly shown that gadodiamide interferes with collagen turnover.^{32,33} This might lead to the abnormal distribution of collagen bundles observed in our study in the gadodiamide-treated group.

Important macroscopic and pathologic lesions were observed in the nonformulated gadodiamide group. These findings are consistent with previously reported studies.^{18,24}

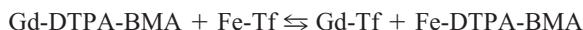
Treatments did not modify the CD34 or TGF β_1 expression in either of the 2 studies (ie, sacrifice at day 11 or 32). In the present work, the expression of these markers was investigated in the papillary dermis. The only study in which GC were administered in rats with impaired renal function under conditions strictly similar to those of the present protocol did not provide histology results.¹⁴ In one study,²⁴ positive CD34 expression was observed in the dermis 5 days after the last of 20 injections in rats treated with nonformulated gadodiamide, formulated gadodiamide, and low stability Gd-EDTA. No CD34 expression was observed in saline-treated rats, in contrast with our study. This discrepancy might be explained by differences in the origin of the anti-rat CD34 antibodies used. In another study,¹⁸ no expression of CD34 was observed 1 day after the 13th dose of 5 or 10 mmol/kg gadodiamide or gadopentetate in rats with normal renal function or 3 days after the 10th dose in SNx rats. However, no detailed data were provided with regard to CD34 staining in the saline-treated rats (the anti-rat CD34 antibody was similar to that used in our study). In our study, a potential effect of GC on CD34 expression was difficult to demonstrate because of the relatively high basal CD34 staining observed in control rats.

Following inflammatory insults, the effect of TGF β was characterized by increased production of ECM components, as well as mesenchymal cell proliferation, migration, and accumulation.³⁴ Tissue fibrosis is primarily attributed to the TGF β_1 isoform,³⁵ which was investigated in our study. TGF β_1 plays an important profibrotic role by inducing the synthesis of α -smooth muscle actin and collagen.^{35,36} Elevated tissue levels of TGF β mRNA have been identified in NSF.³⁷ However, to our knowledge, this marker has never been investigated to date in preclinical, in vivo studies. In the present study, relatively high TGF β_1 expression was observed in saline-

treated rats, although this effect was less intense than that observed for CD34. Neither GC affected the TGF β_1 staining, regardless of the time-point considered. TGF β has been reported to induce down-regulation of CD34 expression by fibrocytes.³⁶ The colocalization of TGF β_1 and CD34 expression was not formally investigated in our study but these markers were probably expressed by the same (fibroblast-like) cells.

Nonformulated gadodiamide-induced release of chemokine MCP-1, at both day 3 and 9. This is consistent with another study³⁸ in which chemokines MCP-1 and MCP-3 were significantly increased 6 hours after the first administration of this compound to rats with normal renal function. MCP-1 has been identified as a profibrotic mediator.^{35,39} Plasma MCP-1 levels are increased in patients with systemic fibrosis.⁴⁰ Increased MCP-1 expression has also been observed in inflammatory kidney diseases.⁴¹ Nonformulated gadodiamide has also been reported to release other cytokines in rats.³⁸ However, no changes of plasma TGF β_1 and TNF α levels were observed under the present study conditions. To our knowledge, the effect of GC on circulating TGF β_1 levels has never been previously investigated. Intense release of IL1 β was observed in the nonformulated gadodiamide-treated group, at day 3, consistent with a systemic proinflammatory effect of this compound.

Decreased plasma transferrin-bound iron levels were measured in rats receiving the nonformulated gadodiamide. A transmetallation phenomenon^{23,28} between Gd³⁺ (associated with its ligand DTPA-BMA) and Fe³⁺ (bound to transferrin, Tf) may be proposed, based on the more favorable thermodynamic constant of Fe-DTPA-BMA compared with that of gadodiamide (or Gd-DTPA-BMA) ($\log K_{\text{therm}}$ values of 21.9 and 16.9, respectively):



There are 2 binding sites for Fe³⁺ with Tf ($\log K_{\text{cond}(1)} = 20.2$ and $\log K_{\text{cond}(2)} = 39.3$).⁴² A transmetallation phenomenon involving one site of iron binding on Tf therefore seems possible (firstly dissociation of Gd-DTPA-BMA followed by translocation of iron between 1 binding site of Tf and DTPA-BMA). However, an increase in plasma levels of iron in healthy volunteers was reported in the phase I study of gadopentetate.⁴³ The subsequent optimization of the gadopentetate pharmaceutical formulation with the addition of 0.1% of the free ligand DTPA restored normal plasma iron levels in healthy volunteers.⁴³ Therefore, our data are not consistent with these results.

Another hypothesis may be proposed: typically, an inflammatory process is associated with anemia and a decrease in serum iron levels.⁴⁴ Although systemic inflammation was clearly found in nonformulated gadodiamide-treated rats, no obvious anemia was observed. The killing of our rats might have been too early to observe anemia.

It has been proposed that the FGF-23 pathway may be involved in the pathogenesis of NSF.⁴⁵ FGF-23 is a peptide predominantly expressed by osteocytes (but also by thymus, brain, and lymph nodes) that regulates phosphorus homeostasis and vitamin D metabolism. FGF-23 inhibits renal and intestinal absorption of phosphate by inhibition of Na-Pi type II transporters.⁴⁶ It has been proposed that, in the context of renal insufficiency, impaired expression of the Klotho protein which is required for FGF-23-mediated receptor activation, would lead to hyperphosphatemia, and via negative feedback, to further overexpression of FGF-23 that may eventually lead to fibroblast proliferation.⁴⁵ In the present study, plasma FGF-23 levels were significantly increased in the commercial gadodiamide-treated group versus controls and gadoterate-treated groups. Interestingly, plasma phosphorus levels were significantly reduced in the gadodiamide-treated group versus control and gadoterate groups. It may be speculated that this effect is the

consequence of the hypophosphatemic effects of FGF-23. Subtotal nephrectomy did not affect plasma phosphorus levels. This is consistent with the published data.⁴⁷ It would be of interest to investigate the effects of GC in SNx rats receiving a phosphate-enriched diet to achieve hyperphosphatemia.

The mechanism of NSF remains speculative, and the exact role of GC is still unclear. Many authors agree that the less stable, linear, and nonionic GC confer a higher risk for NSF.^{5,48–50} This has led to speculations concerning gradual GC dissociation in the body, associated with a subsequent proinflammatory cascade of events leading to aberrant systemic fibrosis.^{11,12} The inverse correlation between total gadolinium levels in the skin of naive or renally impaired rats and the stability of administered GC as well as the occurrence of NSF-like skin lesions in rats exclusively receiving less stable GC,^{24,51} are strongly suggestive of a causal role for dissociated Gd³⁺. However, clinical data indicate that gadolinium is necessary but not sufficient to trigger NSF.¹⁰ The role of cofactors, found in case-control studies (hyperphosphatemia, iron, erythropoietin, renal failure, etc), is indeed a major issue and should be investigated in preclinical studies. Cofactors can be used to increase the sensitivity of in vivo models, as recently shown with erythropoietin and iron.⁵²

In summary, after intravenous administration in rats with impaired renal function, neither gadoterate nor gadodiamide induced macroscopic skin lesions, in contrast with nonformulated gadodiamide, which was associated with a high systemic toxicity. Histopathologic lesions were in the range nonformulated gadodiamide > gadodiamide > gadoterate (limited dermal changes). In the long-term study, small clusters of damaged collagen bundles were found in 3 of 4 gadodiamide-treated rats. Significantly higher plasma FGF-23 levels (associated with a decrease in phosphate levels) were measured in the gadodiamide treated-group than in the saline and gadoterate groups. Decreased plasma transferrin-bound iron levels were measured in the nonformulated gadodiamide group. Overall, the high stability gadoterate was associated with less pathologic and biochemical effects than gadodiamide.

Further studies are needed to better understand the interaction of gadodiamide with collagen fibrils and bundle formation and the involvement of FGF-23 in the mechanism of NSF.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Anthony Saul and Dr. Dominique Debize-Henderson for reviewing the English version of the manuscript.

REFERENCES

- Cowper SE, Boyer PJ. Nephrogenic systemic fibrosis: an update. *Curr Rheumatol Rep*. 2006;8:151–157.
- Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: a review and exploration of the role of gadolinium. *Adv Dermatol*. 2007;23:131–154.
- Weinreb JC, Abu-Alfa AK. Gadolinium-based contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis: why did it happen and what have we learned? *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:1236–1239.
- Port M, Idée JM, Medina C, et al. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biometals*. 2008;21:469–490.
- Thomsen HS. Nephrogenic systemic fibrosis: history and epidemiology. *Radiol Clin North Am*. 2009;47:827–831.
- Broome DR. Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: a summary of the medical literature reporting. *Eur J Radiol*. 2008;66:230–234.
- Abujudeh HH, Kaewlai R, Kagan A, et al. Nephrogenic systemic fibrosis after gadopentetate dimeglumine exposure: case series of 36 patients. *Radiology*. 2009;253:81–89.
- Wertman R, Altun E, Martin DR, et al. Risk of nephrogenic systemic fibrosis: evaluation of gadolinium chelate contrast agents at four American Universities. *Radiology*. 2008;248:799–806.
- Hope TA, Herfkens RJ, Denianke KS, et al. Nephrogenic systemic fibrosis in patients with chronic kidney disease who received gadopentetate dimeglumine. *Invest Radiol*. 2009;44:135–139.
- Idée JM, Port M, Medina C, et al. Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a critical review. *Toxicology*. 2008;248:77–88.
- Morcos SK. Nephrogenic systemic fibrosis following the administration of extracellular gadolinium-based contrast agents: is the stability of the contrast agent molecule an important factor in the pathogenesis of this condition? *Br J Radiol*. 2007;80:73–76.
- Perazella MA. Tissue deposition of gadolinium and development of NSF: a convergence of factors. *Semin Dial*. 2008;21:150–154.
- Newton B, Jiménez SA. Mechanism of NSF: new evidence challenging the prevailing theory. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:1277–1283.
- Pietsch H, Lengsfeld P, Steger-Hartmann T, et al. Impact of renal impairment on long-term retention of gadolinium in the rodent skin following the administration of gadolinium-based contrast agents. *Invest Radiol*. 2009;44:226–233.
- Mahl A, Heining P, Ulrich P, et al. Comparison of clinical pathology parameters with two different blood sampling techniques in rats: retrobulbar plexus versus sublingual vein. *Lab Anim*. 2000;34:351–361.
- Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, et al. Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicol Pathol*. 2004;32:126–131.
- Milliken GA. Analysis of repeated measures design. In: Berry DA, ed. *Statistical Methodology in the Pharmaceutical Sciences*. New York, NY: Dekker; 1990:83–116.
- Grant D, Johnsen H, Juelsrud A, et al. Effects of gadolinium contrast agents in naïve and nephrectomized rats: relevance to nephrogenic systemic fibrosis. *Acta Radiol*. 2009;50:156–169.
- Haylor J, Dencausse A, Vickers M, et al. Nephrogenic gadolinium distribution and skin cellularity following a single injection of gadodiamide in the rat. *Invest Radiol*. 2010;45:507–512.
- Ersoy H, Rybicki FJ. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26:1190–1197.
- US Food and Drugs Administration CfDEaR. Guidance for Industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers; 2005. Available at: www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf. Accessed May 19, 2010.
- Bousquet JC, Saini S, Stark DD, et al. Gd-DOTA: characterization of a new paramagnetic complex. *Radiology*. 1988;166:693–698.
- Idée JM, Port M, Dencausse A, et al. Involvement of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: an update. *Radiol Clin North Am*. 2009;47:855–869.
- Sieber MA, Pietsch H, Walter J, et al. A preclinical study to investigate the development of nephrogenic systemic fibrosis: a possible role for gadolinium-based contrast media. *Invest Radiol*. 2008;43:65–75.
- Harpur ES, Worah D, Hals PA, et al. Preclinical safety assessment and pharmacokinetics of gadodiamide injection, a new magnetic resonance imaging contrast agent. *Invest Radiol*. 1993;28:S28–S43.
- Prasad AS. Clinical manifestations of zinc deficiency. *Annu Rev Nutr*. 1985;5:341–363.
- Pietsch H, Pering C, Lengsfeld P, et al. Evaluating the role of zinc in the occurrence of fibrosis of the skin: a preclinical study. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:374–383.
- Idée JM, Port M, Raynal I, et al. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006;20:563–576.
- Sieber MA, Steger-Hartmann T, Lengsfeld P, et al. Gadolinium-based contrast agents and NSF: evidence from animal experience. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:1268–1276.
- Steger-Hartmann T, Hofmeister R, Ernst R, et al. A review of preclinical safety data for Magnevist (gadopentetate dimeglumine) in the context of nephrogenic systemic fibrosis. *Invest Radiol*. 2010;45:520–528.
- Stratta P, Canavese C, Aime S. Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging, renal failure and nephrogenic systemic fibrosis/nephrogenic fibrosing dermatopathy. *Curr Med Chem*. 2008;15:1229–1235.
- Bhagavathula N, DaSilva M, Aslam MN, et al. Regulation of collagen turnover in human skin fibroblasts exposed to a gadolinium-based contrast agent. *Invest Radiol*. 2009;44:433–439.
- Perone PA, Weber SL, DaSilva M, et al. Collagenolytic activity is suppressed in organ-cultured human skin exposed to a gadolinium-based MRI contrast agent. *Invest Radiol*. 2010;45:42–48.

34. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs. Molecular pathway imprint. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:746–756.
35. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214:199–210.
36. Bucala R. Fibrocytes: discovery of a circulating connective tissue cell progenitor. In: Bucala R, ed. *New Insights into Tissue Repair and Systemic Fibrosis*. Hackensack, NJ: World Scientific; 2008:1–18.
37. Jiménez SA, Artlette CM, Sandorfi N, et al. Dialysis-associated systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy). *Arthritis Rheum*. 2004;50:2660–2666.
38. Steger-Hartmann T, Raschke M, Riefke B, et al. The involvement of pro-inflammatory cytokines in nephrogenic systemic fibrosis. A mechanistic hypothesis based on preclinical results from a rat model treated with gadodiamide. *Exp Toxicol Pathol*. 2009;61:537–552.
39. Distler JHW, Akhmetshina A, Schett G, et al. Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic fibrosis. *Rheumatology*. 2009;48:98–103.
40. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocytes chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic fibrosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol*. 1999;117:159–165.
41. Rovin BH, Rumancik M, Tan L, et al. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest*. 1994;71:536–542.
42. Motekaitis RJ, Sun Y, Martell AE. New synthetic, selective, high-affinity ligands for effective trivalent metal ion binding and transport. *Inorg Chim Acta*. 1992;198–200:421–428.
43. Niendorf HP, Dinger JC, Haustein J, et al. Tolerance data of Gd-DTPA: a review. *Eur J Radiol*. 1991;13:15–20.
44. Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15:4617–4626.
45. Wollanka H, Weidenmaier W, Giersig C. NSF after Gadovist exposure: a case report and hypothesis of NSF development. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 29:3882–3884.
46. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1637–1647.
47. Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, et al. Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21: 911–916.
48. Leiner T, Kucharczyk W. Special issue: nephrogenic systemic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:1233–1235.
49. Perazella MA. Current status of gadolinium toxicity in patients with kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:461–469.
50. Penfield JG, Reilly RF. Nephrogenic systemic fibrosis risk: is there a difference between gadolinium-based contrast agents? *Semin Dial*. 2008;21:129–134.
51. Sieber MA, Lengsfeld P, Frenzel T, et al. Preclinical investigation to compare different gadolinium-based contrast agents regarding their propensity to release gadolinium in vivo and to trigger nephrogenic systemic-like lesions. *Eur Radiol*. 2008;18:2164–2173.
52. Hope TA, High WA, LeBoit PE, et al. Nephrogenic systemic fibrosis in rats treated with erythropoietin and intravenous iron. *Radiology*. 2009;253:390–398.

6.1.2 Résultats et discussion

Nous avons, tout d'abord, souhaité **caractériser le modèle de néphrectomie des 5/6^e**. Contrairement à certains autres travaux (Haylor et coll., 2010), nos rats n'ont pas été néphrectomisés en deux fois (résection d'un rein puis ablation des deux pôles du rein restant après une semaine), mais en une seule fois.

Ce modèle de néphrectomie des 5/6^e est, en fait, classiquement décrit comme un modèle de fibrose rénale plutôt que d'insuffisance rénale (Fleck et coll., 2006). Dans notre étude, il apparaît que la fonction rénale est réduite d'environ **60 %** pendant toute la période d'observation (60,7% à J7 et 57,5% à J61 post-opération), sans évolution notable dans le temps. Nos données sont cohérentes avec ceux de Chamberlain et Shirley (2007) où la fonction rénale était réduite de 64 % deux semaines après l'intervention jusqu'à 32 jours post-chirurgie. Nous avons donc choisi un délai relativement précoce (**10 jours après l'intervention**) pour commencer l'administration des produits. Enfin, on notera que notre modèle de néphrectomie des 5/6^e ne s'accompagne **pas d'une augmentation de la phosphatémie**, ce qui est cohérent avec la littérature (Pietsch et coll., 2009a).

Une **importante morbi-mortalité** est apparue chez les rats ayant reçu le **gadodiamide non formulé** : seuls 2 animaux sur 10 ont survécu jusqu'à la date du sacrifice. Ces animaux ont présenté une symptomatologie associant perte de poids corporel, prostration et piloérection, ce qui nous a amenés à les euthanasier pour des raisons éthiques. De plus, des lésions cutanées sont apparues chez 4 rats sur 10. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature. Ainsi, Grant et coll. (2009) et Sieber et coll. (2008c) rapportent une mortalité élevée pour ce CG quand il n'est pas formulé avec un ligand susceptible de complexer le Gd^{3+} dissocié dans le flacon avant son administration. La survenue de lésions cutanées (épidermiques, hypercellularité, perte de l'espace interstitiel) a été observée avec ce produit dans une étude plus récente (Pietsch et coll. 2011a). Les lésions étaient plus sévères et plus fréquentes lorsque les administrations de gadodiamide non formulé étaient rapprochées (24h contre 14, 28 ou 56 jours).

Dans notre étude, une concentration plasmatique élevée de la cytokine pro-inflammatoire **IL-1 β** et de la chimiokine **MCP-1** ainsi qu'une augmentation importante des **leucocytes** ont été notées dans ce groupe, ce qui suggère une inflammation systémique.

Aucune lésion cutanée macroscopique n'a été notée chez les rats ayant reçu les formes commerciales d'acide gadotérique ou de gadodiamide. Des lésions des fibres de collagène ont été observées pour les deux CG, mais elles ont été clairement **plus importantes** dans le cas du **gadodiamide** (perte de la configuration des fibres, fibres épaisses condensées et coagulées). Cet effet a été confirmé dans l'étude à long terme dans laquelle les lésions histologiques (foyers inflammatoires, fibres de collagènes dégradées) avec le gadodiamide sont dépendantes du temps (effet plus important à J32 qu'à J4) alors qu'aucune lésion n'a été observée avec l'acide gadotérique. Dans le cas du gadodiamide non formulé, des zones de destruction totale de la matrice extracellulaire et une hypercellularité au niveau du

derme ont été observées. Globalement, ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature (Grant et coll., 2009 ; Pietsch et coll., 2009a ; Sieber et coll., 2008a). Néanmoins, aucune modification du nombre de cellules positives pour CD34 n'a été notée dans notre étude, ce qui n'est pas cohérent avec la clinique ou avec une étude effectuée chez le Rat naïf (Sieber et coll., 2008a). Cette différence pourrait s'expliquer par l'utilisation d'anticorps différents. En effet, dans une étude où l'anticorps anti-CD34 utilisé était identique au nôtre, aucune augmentation de ce marqueur n'a été observée après administration de gadodiamide ou de gadodiamide non formulé (Grant et coll., 2009). Il est important de noter que, dans nos conditions, un marquage positif de tous les fibroblastes a été observé, y compris chez les animaux témoins. La recherche de fibrocytes CD34 positifs dans la peau de nos rats ne semble donc pas pertinente.

Cette étude souligne **la forte toxicité du gadodiamide non formulé**, ce qui est cohérent avec la littérature et peut s'expliquer par l'administration concomitante de Gd^{3+} « libre » présent dans la solution injectée.

Les lésions histologiques étaient plus importantes après administration du CG le moins stable, le gadodiamide, par rapport à l'acide gadotérique.

6.2 Rôle de la phosphatémie (Article 3)

6.2.1 Rationnelle

Des études cas-témoins suggèrent que l'**hyperphosphatémie** est un **facteur associé** à la FSN (Marckmann et coll., 2007 ; Prince et coll., 2008). Par ailleurs, l'ajout de phosphate accélère la dissociation des CGs linéaires dans du sérum humain et donc la libération de Gd³⁺ sous forme « libre » (Frenzel et coll., 2008). Il nous est donc apparu nécessaire de documenter le **rôle de l'hyperphosphatémie chez le Rat insuffisant rénal**.

Comme nous l'avons vu précédemment, le modèle d'insuffisance rénale par néphrectomie des 5/6^e n'est pas associé à une hyperphosphatémie. Or, il est fréquent d'observer une hyperphosphatémie associée à une hyperparathyroïdie secondaire et une ostéodystrophie chez les patients insuffisants rénaux chroniques (Coladonato, 2005). Afin d'augmenter la concentration plasmatique de phosphate des rats néphrectomisés des 5/6^e, les rats ont reçu une alimentation enrichie en phosphate selon un protocole décrit dans la littérature (Oste et coll. 2007).

Ce travail s'est déroulé en deux étapes :

- 1). Dans un premier temps, nous avons étudié les conséquences cliniques et histopathologiques de l'hyperphosphatémie (consécutives à l'administration d'une alimentation enrichie en phosphate) chez des rats insuffisants rénaux et ayant reçu du gadodiamide.
- 2). Dans un deuxième temps, nous avons comparé les effets toxicologiques des différentes catégories de CGs (un agent linéaire non ionique, un CG linéaire ionique, un macrocycle ionique et un macrocycle non ionique) et de deux complexes de calcium (un ligand linéaire et un ligand macrocyclique) sur ce nouveau modèle. Nous avons aussi mesuré la concentration et la biodistribution du Gd ainsi que sa forme (complexée ou dissociée) dans différents tissus.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (article 3) intitulée :

Fretellier N, Idée J, Bruneval P, Guerret S, Daubiné F, Jestin G, Factor C, Poveda N, Dencausse A, Massicot F, Laprévotte O, Mandet C, Bouzian N, Port M, Corot C. Hyperphosphataemia sensitizes renally impaired rats to the profibrotic effects of gadodiamide. *Br J Pharmacol.* 2012; 165: 1151-1162.

RESEARCH PAPER

Hyperphosphataemia sensitizes renally impaired rats to the profibrotic effects of gadodiamide

N Fretellier^{1,5}, JM Idée¹, P Bruneval^{2,7}, S Guerret³, F Daubiné⁴, G Jestin¹, C Factor¹, N Poveda¹, A Dencausse¹, F Massicot⁵, O Laprévote^{5,6}, C Mandet⁷, N Bouzian¹, M Port¹ and C Corot¹

¹Guerbet, Research Division, Aulnay-sous-Bois, France, ²Department of Pathology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France, ³Novotec, Lyon, France, ⁴Atlantic Bone Screen, Nantes, France, ⁵Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, France, ⁶Service de Toxicologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Paris, France, and ⁷INSERM U970, Department of Pathology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Correspondence

Nathalie Fretellier, Guerbet, Research Division, BP 57400, Roissy Charles de Gaulle Cedex, France. E-mail: nathalie.fretellier@guerbet-group.com

Keywords

nephrogenic systemic fibrosis; hyperphosphataemia; renal impairment; gadolinium chelates; relaxometry; gadolinium; magnetic resonance imaging; contrast agents

Received

1 April 2011

Revised

20 June 2011

Accepted

27 June 2011

BACKGROUND AND PURPOSE

Hyperphosphataemia is common in patients with nephrogenic systemic fibrosis (NSF). NSF has been linked to administration of gadolinium (Gd) chelates (GCs) and elevated serum phosphate levels accelerate the release of Gd from linear, non-ionic GCs but not macrocyclic GCs. Hence, we determined whether hyperphosphataemia is a cofactor or risk factor for NSF by investigating the role of hyperphosphataemia in renally impaired rats.

EXPERIMENTAL APPROACH

Firstly, the clinical, pathological and bioanalytical consequences of hyperphosphataemia were investigated in subtotal nephrectomized (SNx) Wistar rats following i.v. administration of the non-ionic, linear GC gadodiamide ($5 \times 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$). Secondly, the effects of several GCs were compared in these high-phosphate diet fed rats. Total Gd concentration in skin, femur and plasma was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and free Gd³⁺ in plasma by liquid chromatography coupled to ICP-MS. Relaxometry was used to measure dissociated Gd in skin and bone.

KEY RESULTS

Four out of seven SNx rats fed a high-phosphate diet administered gadodiamide developed macroscopic and microscopic (fibrotic and inflammatory) skin lesions, whereas no skin lesions were observed in SNx rats treated with saline, the other GCs and free ligands or in the normal diet, gadodiamide-treated group. Unlike the other molecules, gadodiamide gradually increased the r_1 relaxivity value, consistent with its *in vivo* dissociation and release of soluble Gd.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Hyperphosphataemia sensitizes renally impaired rats to the profibrotic effects of gadodiamide. Unlike the other GCs investigated, gadodiamide gradually dissociates *in vivo*. Our data confirm that hyperphosphataemia is a risk factor for NSF.

Abbreviations

α -SMA, α -smooth muscle actin; DTPA, diethylene triamine pentaacetic acid; EC, endothelial cells; ECM, extracellular matrix; Gd, gadolinium; GC, gadolinium chelates; HPLC, high performance liquid chromatography; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; MRI, magnetic resonance imaging; NSF, nephrogenic systemic fibrosis; P-4-OH, prolyl-4-hydroxylase; SNx, subtotal nephrectomy; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1; DOTA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid

Introduction

Nephrogenic systemic fibrosis (NSF) is a rare and highly debilitating systemic fibrosing disorder occurring in patients with severe or end stage renal failure, usually those requiring dialysis (Cowper *et al.*, 2001). NSF is typically characterized by extensive thickening and hardening of the skin associated with contractures around the joints impairing mobility, pruritus and sharp pain. Histologically, NSF is characterized by dermal fibrosis with CD34 and procollagen 1-positive cells, prominent collagen bundles, frequent presence of myxoid substance between fibroblasts and collagen bundles, and increased numbers of macrophages and factor XIIIa-positive dendritic cells (Braverman and Cowper, 2010).

The link between administration of gadolinium (Gd) chelates (GCs), used as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI), and the disease, suggested for the first time in 2006 (Grobner, 2006), is now acknowledged. Briefly, there are two structurally distinct categories of GCs: (i) 'macrocyclic' molecules in which the Gd³⁺ ion is 'caged' into the pre-organized cavity of the ligand; and (ii) 'linear' chelates in which the ligand is wrapped around the metal ion. GCs can also be either 'non-ionic' (in which case three carboxylate functions neutralize the three positive charges of Gd³⁺) or 'ionic' (where additional carboxylic acid groups are salified with either meglumine or sodium) (Port *et al.*, 2008). GCs differ in terms of their thermodynamic and kinetic stabilities. High kinetic stability provided by the macrocyclic structure combined with high thermodynamic stability minimize the amount of free Gd³⁺ that can be released from the parent chelate (Port *et al.*, 2008). Virtually all published cases of NSF have been associated with prior administration of linear GCs (Broome, 2008; Perazella and Reilly, 2011).

The mechanism of NSF is not fully understood despite extensive research (Vakil *et al.*, 2009; Varani *et al.*, 2009; Edward *et al.*, 2010). Clinically relevant preclinical models are needed to more clearly understand the mechanism of this disease. Rats submitted to subtotal (5/6) nephrectomy (SNx) have been widely used as a model of NSF (Grant *et al.*, 2009; Pietsch *et al.*, 2009; Haylor *et al.*, 2010; Fretellier *et al.*, 2011a). Overall, these studies concluded that fibrotic-like lesions can be induced in rats treated with the linear GC gadodiamide.

Elevated plasma phosphate levels have been shown to accelerate the release of free Gd³⁺ from linear, non-ionic GCs such as gadodiamide, whereas macrocyclic GCs remained stable in human serum at both normal and high phosphate levels (Frenzel *et al.*, 2008). As higher serum phosphate levels have been reported in patients with nephrogenic systemic fibrosis compared with sex- and age-matched renal failure control patients (Marckmann *et al.*, 2007), the purpose of the present study was to: (i) investigate the clinical and pathological consequences of hyperphosphataemia in renally impaired rats following administration of the linear, non-ionic GC gadodiamide; and (ii) compare the clinical and biochemical effects of all categories of GCs and free ligands on SNx rats fed a high-phosphate diet and the possibility of *in vivo* dissociation of GCs, by using the relaxometry method (Fretellier *et al.*, 2011b).

Our data indicate that hyperphosphataemia sensitizes renally impaired rats to the profibrotic effects of the linear and non-ionic GC gadodiamide. No effects were observed for

the other categories of GCs and the free ligands Ca-DOTA and Ca-DTPA. In gadodiamide-treated rats, increased r_1 relaxivity values were found in both femur and skin. These results indicate gradual *in vivo* dissociation of gadodiamide, whereas the other GCs remained stable.

Methods

Animals

All studies were carried out on male Wistar rats from Centre d'Élevage René Janvier (CERJ) (Le Genest Saint-Isle, France), aged 6 weeks and weighing 170 ± 7 g. The animals underwent one-step subtotal (5/6) nephrectomy performed at CERJ: animals were anaesthetized with ketamine ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and xylazine ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The right kidney was exposed via a flank incision, the adrenal gland was separated from the upper pole and the kidney was decapsulated. The renal pedicle was ligated and the right kidney was removed. The left kidney was subsequently decapsulated and the adrenal gland was separated from the upper pole. Ligatures were placed around the upper and lower poles and the poles were then excised. An intravenous injection of $1.0 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ of saline was performed at completion of surgery to compensate for blood loss. The animals were housed one per cage at an ambient temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, hygrometry of $45 \pm 10\%$, with 12/12 light/dark cycles. Animals had free access to water and animal chow.

All animal care and experimental procedures were carried out according to French regulations and in compliance with the European Economic Community Directive (2010/63/EU) on animal welfare. The protocol was approved by the local ethics committee.

Role of hyperphosphataemia (Study 1)

Male Wistar rats subjected to subtotal (5/6) nephrectomy ($n = 7$ to $8/\text{group}$) received a normal phosphate (0.6%) diet or a high-phosphate (1.1%) diet and were allocated to single daily i.v. injections of $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($5.0 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) of gadodiamide or saline ($5.0 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) for 5 consecutive days, starting 10 days after subtotal nephrectomy. The 1.1% phosphate diet was given to rats throughout their lifespan, including *in utero* period as their mothers were fed with this diet from the 11th day of gestation. For Gd measurement, a skin biopsy was performed on Day 4 after the first administration, with a biopsy punch (6 mm diameter) and the wounds were then sutured. The rats were killed (exsanguination under isoflurane anaesthesia) 11 days after the first administration. All injections and skin samples were performed under isoflurane/oxygen (3.5% induction, then 2.5%, $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ oxygen) anaesthesia.

Comparison of various GCs and ligands in SNx and rats fed a high-phosphate diet (Study 2)

Male Wistar rats subjected to subtotal (5/6) nephrectomy ($n = 6$ to $8/\text{group}$) received a high-phosphate (1.1%) diet and were allocated to single daily i.v. injections of $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ of gadoterate, gadodiamide, gadobenate, gadobutrol or $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ of the ligands Ca-DTPA or Ca-DOTA or saline

used as control (5.0 mL·kg⁻¹) for 5 consecutive days, starting 10 days after subtotal nephrectomy. Skin biopsies were performed on Days 1 and 8 after the first administration. The rats were killed 25 days after the first administration.

Macroscopic skin findings and histopathology

All rats were examined for macroscopic skin changes before the first injection and then daily throughout the study. Skin biopsy samples were fixed in 4% neutral buffered formalin. After routine dehydration, the samples were embedded in paraffin, sectioned (5 µm thickness) and stained by haematoxylin-eosin-saffron staining for histopathological analysis (Studies 1 and 2), picosirius red to detect the presence of collagen (Study 1) and Alcian blue for acidic mucopolysaccharides (Study 1).

Immunohistochemical staining was performed in both studies to detect CD34 and TGFβ₁ using anti-CD34 goat antibody (diluted to 1:1000, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and anti-TGFβ₁ rabbit antibody (diluted to 1:250, GeneTex, San Antonio, TX, USA) using ImmPRESS polymerized reporter peroxidase staining (ImmPRESS anti-goat Ig [peroxidase] kit [MP 7405] and ImmPRESS anti-rabbit Ig [peroxidase] kit [MP 7401], respectively; Vector Laboratories Burlingame, CA, USA).

In Study 2, in addition to CD34 and TGFβ₁, immunostaining of S100A4 (i.e. fibroblast-specific protein-1) (rabbit antibody diluted to 1:500, Abcam, Paris, France), using anti-rabbit biotinylated antibody (AbCys, Paris, France) staining, α-smooth muscle actin (α-SMA) (mouse antibody diluted to 1:600, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France) using anti-mouse biotinylated antibody (AbCys) staining, macrophages (ED-1 stain) (mouse antibody diluted to 1:100, AbD Serotec, Colmar, France) using anti-mouse biotinylated antibody (AbCys) staining, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) (goat antibody diluted to 1:100, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) using anti-goat biotinylated antibody (AbCys) staining and prolyl-4-hydroxylase (P-4-OH) (mouse antibody diluted to 1:100, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) using anti-mouse biotinylated antibody (AbCys) staining, was performed at the end of the study. Histopathological lesions were evaluated semi-qualitatively using a 4-point severity grading scale (– absent; ± mild; + moderate; ++ severe) for each animal. Histopathological examinations were performed in a blinded fashion by certified histopathologists (S. G. in Study 1 and P. B. in Study 2) in accordance with the guidelines of the Society of Toxicological Pathology (Crissman *et al.*, 2004).

Biochemistry

In Study 2, the plasma levels of total calcium, phosphorus, transferrin-bound iron and creatinine (Vitros-II autoanalyzer, OrthoClinical Diagnostics Inc., Issy-les-Moulineaux, France) were measured on Days 0 (i.e. 3 days before the first administration), 5 and 25. In addition, plasma levels of monocytes chemotactic protein-1 (MCP-1) (Bender MedSystems, Vienna, Austria), TIMP-1 and TGFβ₁ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were measured by ELISA on Day 5. Plasma levels of TGFβ₁ and fibroblast growth factor-23 (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan) were measured by ELISA on Day 25. Blood samples were

taken from the sublingual vein (Mahl *et al.*, 2000). All assays were performed in duplicate.

Gadolinium determination

In Study 2, Gd levels in plasma, skin, liver and femoral epiphyseal samples, were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) on ELAN DRC Plus® (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Waltham, MA, USA). A standard curve of inorganic Gd (0.64 nmol·L⁻¹ to 1.30 µmol·L⁻¹) in 6.5% HNO₃ was used by monitoring the signal of the ¹⁵⁷Gd isotope. The acceptance limits (total error) were set at ±14%. Results are expressed in nmol Gd·g⁻¹ wet tissue weight (tissues samples) or µmol·L⁻¹ of plasma. The limit of quantification was 0.64 nmol·L⁻¹. Samples above the limit of detection (0.19 nmol·L⁻¹) but below the limit of quantification were given an arbitrary value of 0.32 nmol·L⁻¹. The dissociated Gd³⁺ concentration was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) connected to an ICP-MS system as described elsewhere (Fretellier *et al.*, 2011b).

Relaxometry measurements

In Study 2, the presence of dissociated Gd in skin biopsies and trabecular femur was assessed by relaxometry technique because mass spectrometry cannot characterize the exact nature of Gd species in solid tissues. This technique has been described elsewhere (Fretellier *et al.*, 2011b). Briefly, the samples were mashed, differently according to the matrix, and were diluted (1/11) in D₂O/H₂O (90/10) mix. Longitudinal relaxation times (T₁) were measured on Bruker Minispec (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) at 60 MHz (i.e. 1.42 T) and 37°C.

The r₁ relaxivity value could not be determined when the 1/T₁_{sample} – 1/T₁_{diamagnetic} value was less than 20% of 1/T₁_{diamagnetic} in the absence of Gd precipitation (i.e. because of a low total Gd concentration in the sample). The Gd concentration was then determined by ICP-MS. The Gd concentration in tissue samples was corrected for an estimated 97% water content, based on unpublished in-house studies. Relaxivities (r₁ apparent value) were calculated according to the formula: r₁ = (1/T₁_{sample} – 1/T₁_{diamagnetic})/[Gd], where relaxation rate (1/T₁) was expressed in s⁻¹, Gd concentration in mM and relaxivity r₁ in mM⁻¹·s⁻¹.

Relaxometry studies (*in vitro* spiking studies) on biological matrices were performed by spiking with GC (from commercial solutions) (range of 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mM) on D₂O/H₂O mix, rat plasma, skin and trabecular femur from untreated rats. The term '*in vitro* studies' refers to all experiments performed by spiking GC on tissue matrices (to obtain the reference range of r₁ relaxivities) and '*in vivo* studies' refers to all experiments performed on test animals. Based on unpublished *in vitro* relaxometry studies, the uncertainty of relaxivity r₁ measurements (with Gd concentration measured by ICP-MS) was set at r₁ ±23%. The *in vitro* r₁ relaxivity range represents the *in vitro* r₁ relaxivity value (obtained from spiking studies) ± uncertainty of 23%.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SD. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Results were analysed by repeated-

measures ANOVA (body weight, biochemistry data, plasma Gd concentration) or by one-way ANOVA (Gd concentrations) followed, when relevant, by a Bonferroni or Dunnett's test. Skin relaxivity values were analysed by Student's *t*-test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Materials

Meglumine gadoterate (Dotarem, batch 09GD022A, Guerbet, Villepinte, France), gadodiamide (Omniscan, batch 10758384 and batch 10942539, General Electric Healthcare, Chalfont St Giles, UK), dimeglumine gadobenate (MultiHance, batch S9P252A, Bracco, Milan, Italy), gadobutrol (Gadovist, batch 9A033A, Bayer Healthcare, Berlin, Germany) were purchased from respective manufacturers. The ligands Ca-DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid) and Ca-DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid) were synthesized at Guerbet Research Dpt. Saline was purchased from Lavoisier (Paris, France).

Results

Characterization of the experimental model

An increase in plasma creatinine (66.8 ± 20.1 vs. $25.8 \pm 2.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $P < 0.01$) and phosphorus (3.4 ± 0.8 vs. $2.0 \pm 0.1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $P < 0.01$) levels was observed in SNx rats fed the high-phosphate diet compared with sham operated rats. Plasma calcium levels remained unchanged (2.1 ± 0.2 vs. $2.4 \pm 0.1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, not significant). Pathological lesions consistent with osteodystrophy (osteitis fibrosa) were found in both the femur and tibia of SNx rats fed a high-phosphate diet (data not shown).

Role of hyperphosphataemia (Study 1)

Macroscopic and microscopic findings. The plasma phosphate level was higher in SNx rats receiving a high-phosphate diet than in SNx rats fed a normal diet (2.4 ± 0.4 and $1.9 \pm 0.2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; $P < 0.05$). Plasma calcium levels were similar in the two groups (2.2 ± 0.2 and $2.3 \pm 0.2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; not significant). No skin lesions were observed in the gadodiamide- and saline-treated groups receiving a normal-phosphate diet, while four out of the seven gadodiamide-treated rats fed a high-phosphate diet showed macroscopic skin lesions (ulcerations and scabs) in the neck, back and abdominal skin for the first time on Day 8 (i.e. after the first injection). No significant differences in body weight changes were observed between these groups.

Histologically, small superficial epidermal lesions, degradation and merging of collagen fibres in the dermis with disorganization of the extracellular matrix (ECM) were observed in the gadodiamide group fed with normal diet, while numerous zones of epidermal necrosis, a moderately increased dermal cellularity, the presence of multinucleated giant cells, more abnormalities of dermal collagen structures (dense and short collagen bundles alternating with altered collagen fibres) and more intense TGF β_1 immunostaining were observed in the gadodiamide-treated rats fed a high-phosphate diet (Figure 1).

Comparison of various GCs and ligands in rats fed a high-phosphate diet (Study 2)

Macroscopic and microscopic findings. Ulcerative and squamous skin eruptions occurred (from Day 8 until Day 23) in five of the eight rats receiving gadodiamide, and worsened in four animals or improved in one, while no skin lesions were observed in the rats treated with saline, the other GCs and the free ligands. Four gadodiamide-treated rats had to be killed for ethical reasons because of the severity of the skin lesions and loss of body weight (one rat was killed at Day 5, one at Day 15, one at Day 22 and one at Day 23). No scratching was observed. One gadoterate-treated rat was found dead at Day 8. No significant differences in body weight changes were observed between these groups.

On histological examination, the skin was considered to be abnormal in six of the eight rats of the gadodiamide-treated group (three rats with macroscopic skin lesions and killed, one rat without macroscopic skin lesions and killed and two rats without skin lesions and not killed before the end of the experiment), while no histological skin changes were observed in the other groups. Lesions consisted of bands of inflammatory dermal fibrosis associated with hyperkeratosis and calcifications (Figure 2). ED-1, TIMP-1 and TGF β_1 -positive macrophages accumulated in the dermis (Figure 2, Table 1) and were associated with an increased density of CD34+ and S100A4+ spindle cells. Positive immunostaining for TGF β_1 , TIMP-1 and P-4-OH (Figure 2) was observed for spindle cells of gadodiamide-treated rats (6/8). No α -smooth muscle actin expression was detected, irrespective of the group. In all other groups and in the controls, immunohistochemical patterns were normal except for one rat treated with gadobenate, in which a fibro-inflammatory focus located in the dermis with the presence of ED-1 and TGF β_1 -positive cells was observed.

Biochemistry. No significant differences between the groups were found regarding the plasma levels of all tested parameters at Day 0. The plasma creatinine level of all treated-groups was consistent with renal impairment (data not shown). A slight and non-significant decrease in plasma phosphorus levels was observed from Day 5 in the gadodiamide, gadobutrol, gadobenate and Ca-DOTA-treated groups (Table 2). A substantial decrease in plasma phosphorus levels ($\sim 30\%$) was observed at Day 5 in the Ca-DTPA-treated group ($P < 0.05$ vs. Day 0 values).

A slight and non-significant increase in plasma iron concentration was also observed on Day 5 in saline, gadoterate, gadobutrol and Ca-DOTA-treated groups. Because analytical interference of iron measurement was observed with Ca-DTPA, gadobenate and gadodiamide, no results are provided for these compounds (Table 2).

No significant differences in plasma levels of TGF β_1 and fibroblast growth factor-23 were observed between the various groups (data not shown). The GCs and ligands had no effect on plasma levels of MCP-1 and TIMP-1 (measured on Day 5) (data not shown). However, an increase in the plasma levels of MCP-1 (17 times vs. controls) and TIMP-1 (seven times vs. controls) was observed in one gadodiamide-treated rat (this animal was killed at Day 5).

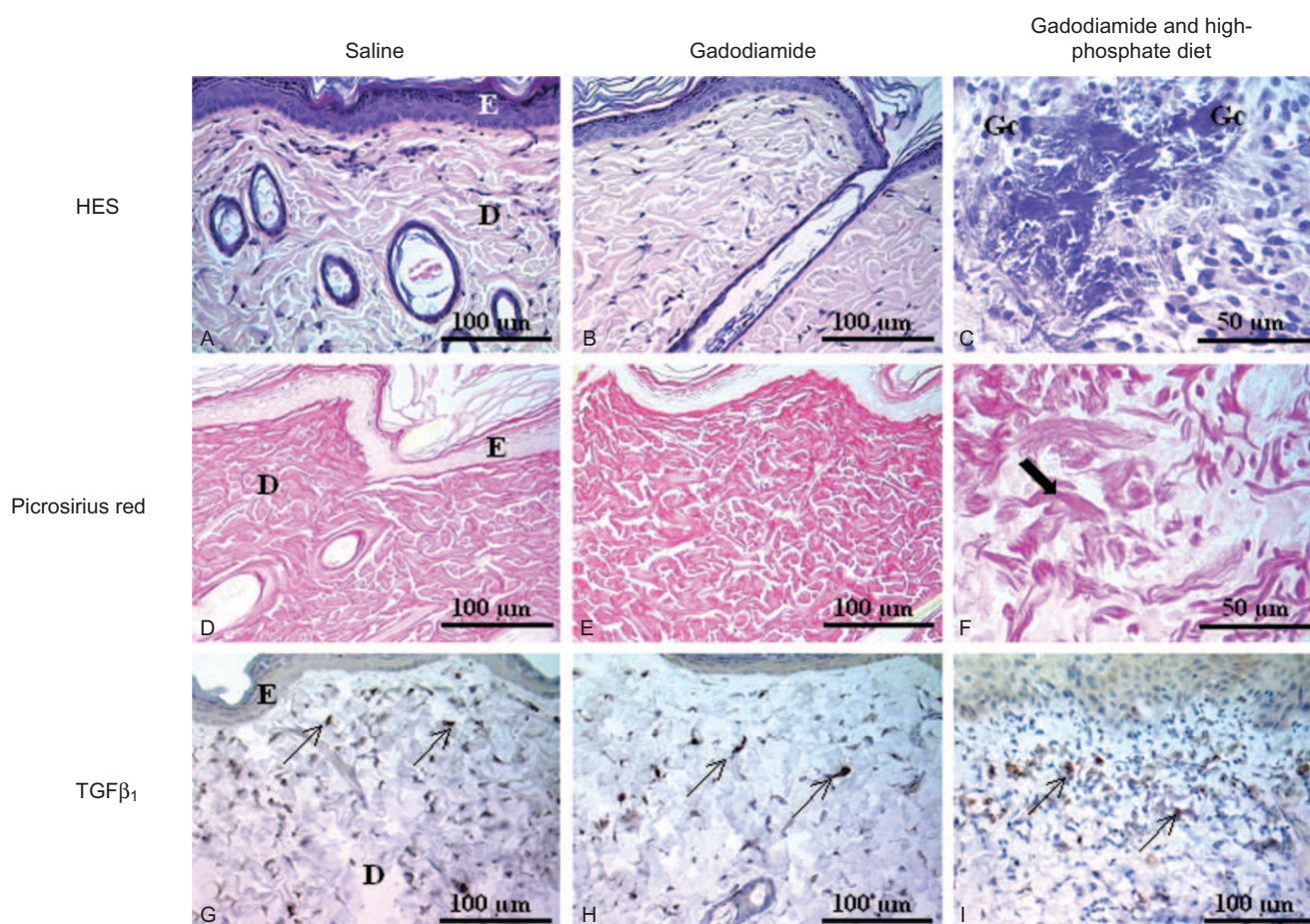


Figure 1

Histological skin lesions in the papillary dermis: haematoxylin and eosin staining (A–C) to analyse cellular lesions, picrosirius red staining (D–F) to detect changes in extracellular matrix and TGF β_1 (G–I) to detect spindle cells (Study 1). Saline (A, D, G): epidermal thickness was constant; the dermis was weakly cellular, and ECM was homogeneous. TGF β_1 was only expressed on several spindle cells. Gadodiamide (B, E, H): local epidermal necrosis and presence of some inflammatory cells in the papillary (or superficial) dermis. ECM was heterogeneous, with small clusters of collagen fibres. TGF β_1 immunohistochemical detection was slightly increased in papillary and reticular dermis. Gadodiamide in SNx rats fed a high-phosphate diet (C, F, I): numerous foci of epidermal necrosis; some foci of myxoid tissue, necrosis, presence of multinucleated giant cells, [Gc] included in fragmented collagen fibres, were observed (C, F), as well as an increase in subepithelial TGF β_1 immunostaining (I). (F) Shows short and dense collagen bundles alternating with altered fibres. D, dermis; E, epidermis; HES, haematoxylin-eosin-saffron.

Plasma levels of total and dissociated gadolinium. No significant differences in plasma total Gd levels were observed in the gadoterate, gadodiamide or gadobutrol-treated groups (Figure 3), while plasma total Gd levels were lower with gadobenate than with the other GCs ($P < 0.05$ at Day 8). No dissociated Gd $^{3+}$ was found in the plasma of gadobutrol and gadobenate-treated rats, regardless of the time-point, while two rats (out of eight) showed the presence of Gd $^{3+}$ levels at Day 8 in the gadoterate treated-group (Table 3). Marked release of Gd $^{3+}$ was observed with gadodiamide in all treated animals (Table 3).

Total gadolinium levels in skin. No significant differences in total Gd concentration in skin at Day 8 were observed between treated groups except for gadobenate-treated rats, in which the Gd concentration was significantly lower than in the other groups (Figure 4). A dramatic decrease in the skin

total Gd concentration at Day 25 (vs. Day 8) (Figure 4) was observed in the gadoterate, gadobutrol and gadobenate-treated groups. The total Gd concentration in dorsal skin was higher ($P < 0.001$) with gadodiamide (153.0 ± 82.7 nmol.g $^{-1}$) than in the other GC-treated groups at Day 25.

Total gadolinium levels in the femur and liver. Total Gd concentrations in the femur and liver were higher in the gadodiamide-treated group than in the other treated groups ($P < 0.001$) (Figure 5A and B).

Relaxometry studies. The r_1 relaxivity values obtained in water (90/10 D $_2$ O/H $_2$ O solution), rat skin, femur, plasma and liver matrices (*in vitro* 'spiking' studies) are shown in Table 4.

In *in vivo* studies, the r_1 relaxivity values of gadoterate or gadobutrol were situated in the r_1 *in vitro* range in skin (Days 1 and 8) and femur (Figures 6 and 7). However, in 19/25 rats

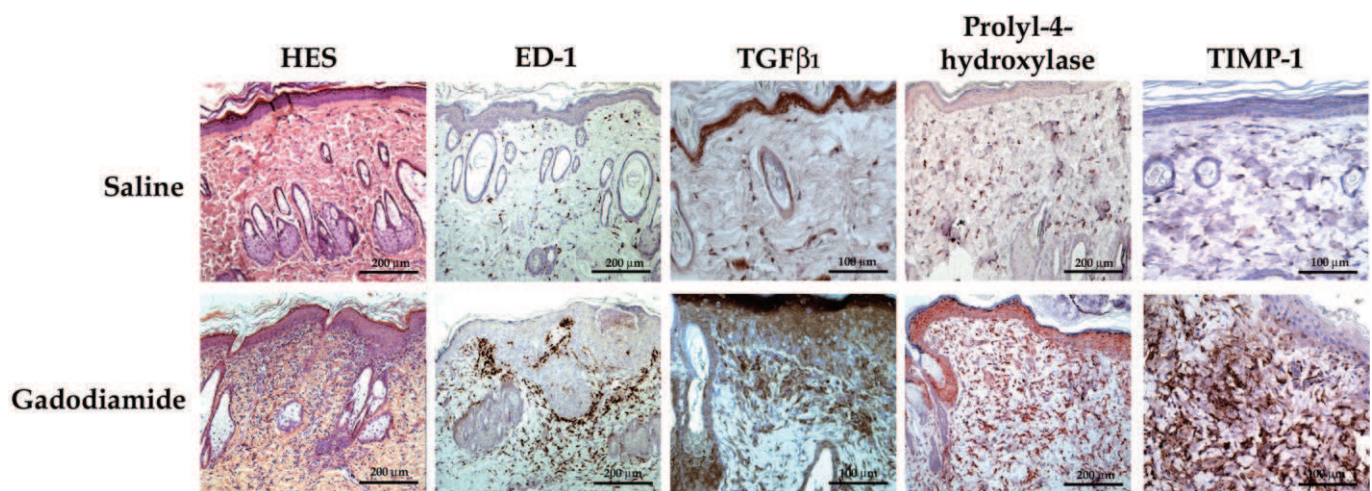


Figure 2

Histological (haematoxylin-eosin-saffron [HES]), and immunohistochemical (ED-1, TGF β ₁, prolyl-4-hydroxylase, TIMP-1) analysis of dorsal skin in SNx rats fed a high-phosphate diet (typical examples from Study 2). Bands of inflammatory dermal fibrosis associated with hyperkeratosis and calcifications were observed (HES) as well as the presence of ED-1 + macrophages, TGF β ₁, prolyl-4-hydroxylase and TIMP-1 immunostaining in the dermis.

Table 1

Semi-quantitative immunohistochemical analysis of dorsal skin (number of rats with positive immunostaining)

Treatment	No of rats	CD34	ED-1	TGF β ₁	S100A4	α -SMA	P-4-OH	TIMP-1
Saline	5	(+) [sc and ECs]	(\pm)	(-)	(+) [sc]	(-)	(\pm)	(\pm)
Gadoterate	8	(+) [sc and ECs]	(\pm)	(-)	(+) [sc]	(-)	(\pm)	(\pm)
Gadodiamide	8	(+) [sc and ECs] but \uparrow number of sc	(\pm) = 3 (++) = 5	(-) = 2 (foci) = 2 (+) = 1 (++) = 3	(+) [sc] but \uparrow number of sc	(-)	(\pm) = 2 Foci (++) = 6	(\pm) = 2 Foci (++) = 6
Gadobenate	7	(+) [sc and ECs]	(\pm) = 6 (++) = 1 (focus)	(-) = 6 (++) = 1 (focus)	(+) [sc]	(-)	(\pm)	(\pm)
Gadobutrol	7	(+) [sc and ECs]	(\pm)	(-)	(+) [sc]	(-)	(\pm)	(\pm)
Ca-DOTA	6	(+) [sc and ECs]	(\pm)	(N/A)	(N/A)	(N/A)	(N/A)	(N/A)
Ca-DTPA	6	(+) [sc and ECs]	(\pm)	(N/A)	(N/A)	(N/A)	(N/A)	(N/A)

'sc' indicates spindle cells and 'ECs' indicates endothelial cells. - = absence, \pm = mild, + = moderate, ++ = severe, N/A = not available.

(gadoterate, gadobutrol and gadobenate), the r_1 value could not be determined at Day 25 because the $1/T1_{\text{sample}} - 1/T1_{\text{diamagnetic}}$ value was less than 20% of $1/T1_{\text{diamagnetic}}$ (low total Gd concentration in the samples). A slight and non-significant increase in the r_1 value was observed at Day 8 (vs. Day 1 value) in skin samples from gadobenate-treated rats.

A gradual increase in the r_1 relaxivity value ($P < 0.01$ at Day 8 vs. Day 1 and $P < 0.05$ at Day 25 vs. Day 1) was observed in the dorsal skin of gadodiamide-treated rats (Figure 6).

In the gadodiamide (all rats) and gadobenate ($n = 2$ measurable) groups, the r_1 value exceeded the r_1 *in vitro* range in femur samples (Figure 7). A dramatic increase in the *in vivo* r_1

relaxivity value ($38.2 \pm 10.4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) was observed in the liver in the gadobenate-treated group, compared with the *in vitro* r_1 relaxivity value ($4.9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).

Discussion and conclusions

Most patients with end-stage renal failure present hyperphosphataemia, which is associated with secondary hyperparathyroidism, osteodystrophy and increased mortality (Coladonato, 2005). In two case-control studies, significantly higher serum phosphate levels were observed in NSF patients, compared with patients with chronic kidney disease but with

Table 2

Plasma phosphorus or iron levels on Day 0 and percentage change (%) of plasma phosphorus or iron levels compared with Day 0

Treatment	Phosphorus Plasma (phosphorus) (mmol·L ⁻¹) Day 0	Percentage change versus Day 0 (%)		Iron Plasma (iron) (μmol·L ⁻¹) Day 0	Percentage change versus Day 0 (%)	
		Day 5	Day 25		Day 5	Day 25
Saline	3.3 ± 0.8	-5	-10	43.4 ± 15.6	+12	-2
Gadoterate	3.0 ± 0.2	+6	-1	42.1 ± 7.2	+21	+18
Gadodiamide	3.1 ± 0.3	-7	-13	37.1 ± 8.3	§	§
Gadobutrol	2.7 ± 0.4	-8	-15	43.8 ± 9.5	+5	+3
Gadobenate	2.8 ± 0.5	-13	-15	47.8 ± 9.8	§	§
Ca-DOTA	2.8 ± 0.3	-8	-15	33.5 ± 6.0	+18	+3
Ca-DTPA	2.8 ± 0.2	-30*	-13	37.8 ± 8.6	§	§

**P* < 0.05 versus control (saline) group.

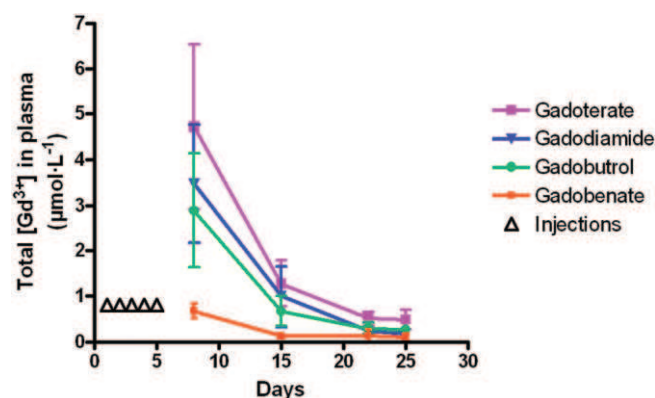
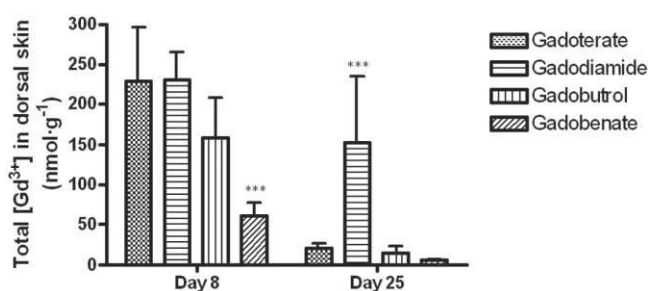
§Analytical interference. Uninterpretable data.

Table 3

Dissociated Gd concentration in plasma on Day 8 and Day 15 (HPLC-ICP-MS) and dissociated/total Gd concentration ratio

Treatment	Day 8 Dissociated [Gd ³⁺] in plasma (μmol·L ⁻¹)	Dissociated/total Gd concentration ratio (%)	Day 15 Dissociated [Gd ³⁺] in plasma (μmol·L ⁻¹)	Dissociated/total Gd concentration ratio (%)
Gadoterate	<LOD (<i>n</i> = 6) 1.1 (<i>n</i> = 2)	36 (<i>n</i> = 2)	<LOD (<i>n</i> = 7)	-
Gadodiamide	2.4 ± 0.9 (<i>n</i> = 7)	71 ± 23 (<i>n</i> = 7)	<LOD (<i>n</i> = 3) 1.3 ± 0.9 (<i>n</i> = 4)	110 ± 10 (<i>n</i> = 4)
Gadobutrol	<LOQ (<i>n</i> = 7)	-	<LOD (<i>n</i> = 4) <LOQ (<i>n</i> = 3)	-
Gadobenate	<LOQ (<i>n</i> = 7)	-	<LOD (<i>n</i> = 1) <LOQ (<i>n</i> = 6)	-

LOD indicates limit of detection and LOQ indicates limit of quantification.

**Figure 3**Total Gd concentration measured in plasma of rats subjected to subtotal nephrectomy and high-phosphate diet receiving each GC (5 × 2.5 mmol·kg⁻¹ IV) (ICP-MS measurement) between Day 8 and Day 25. **P* < 0.05 versus other GCs.**Figure 4**Total Gd concentration measured in skin samples of rats subjected to subtotal nephrectomy and high-phosphate diet receiving each GC (5 × 2.5 mmol·kg⁻¹ IV) on Day 8 and Day 25 (rat killed) (ICP-MS measurement). In untreated rats (control group), the total Gd concentration in skin was 1.9 ± 1.3 nmol·g⁻¹ on Day 8 and 1.7 ± 1.4 nmol·g⁻¹ on Day 25. ****P* < 0.001 versus all GC treated-groups.

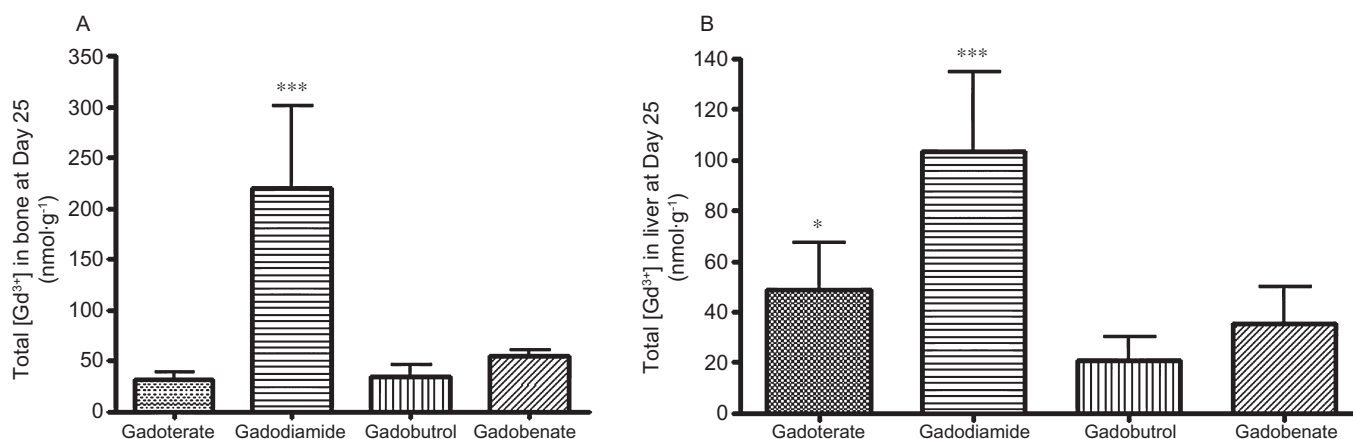


Figure 5

Total Gd concentration measured in bone (A) or in liver (B) samples of SNx rats fed a high-phosphate diet receiving each GC ($5 \times 2.5 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v.) on Day 25 (rat killed) (ICP-MS measurement). In untreated rats (control group), the total Gd concentration was $0.8 \pm 1.2 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ in bone samples and below the limit of quantification in liver samples. *** $P < 0.001$ versus all GC-treated groups. * $P < 0.05$ versus gadobutrol.

Table 4

In vitro r_1 relaxivity value (spiking studies with gadoterate, gadodiamide, gadobutrol or gadobenate [60 MHz, 37°C]) in $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ and various tissue matrices from control rats

Matrix	<i>In vitro</i> r_1 relaxivity ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) ($\pm 23\%$)			
	Gadoterate	Gadodiamide	Gadobutrol	Gadobenate
$\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (90/10)	3.3 [2.5–4.1]	3.7 [2.9–4.6]	3.8 [2.9–4.7]	4.8 [3.7–5.9]
Trabecular Femur	3.8 [2.9–4.7]	4.6 [3.5–5.7]	4.5 [3.5–5.6]	4.6 [3.5–5.7]
Dorsal skin	3.0 [2.3–3.7]	4.5 [3.5–5.6]	3.5 [2.7–4.3]	4.8 [3.7–5.9]
Plasma	3.7 [2.9–4.6]	4.1 [3.2–5.0]	4.4 [3.4–5.4]	5.7 [4.4–7.0]
Liver	–	–	–	4.9 [3.7–5.9]

The uncertainty of relaxivity r_1 measurements (Gd concentration measured by ICP-MS) was set at $r_1 \pm 23\%$.

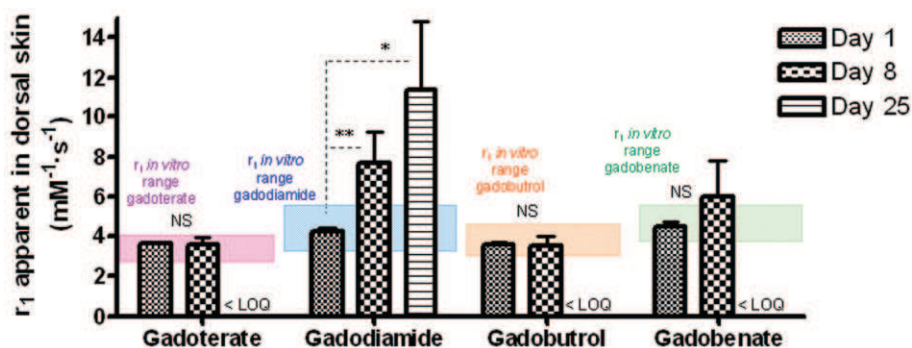


Figure 6

Relaxivity r_1 values (60 MHz, 37°C) in skin samples of SNx rats fed a high-phosphate diet treated with gadoterate, gadodiamide, gadobutrol or gadobenate on Days 8 and 25 (rat killed). * $P < 0.05$ versus gadobenate and gadobutrol. ** $P < 0.01$ versus all GC-treated groups. LOQ indicates limit of quantification. NS, not significant.

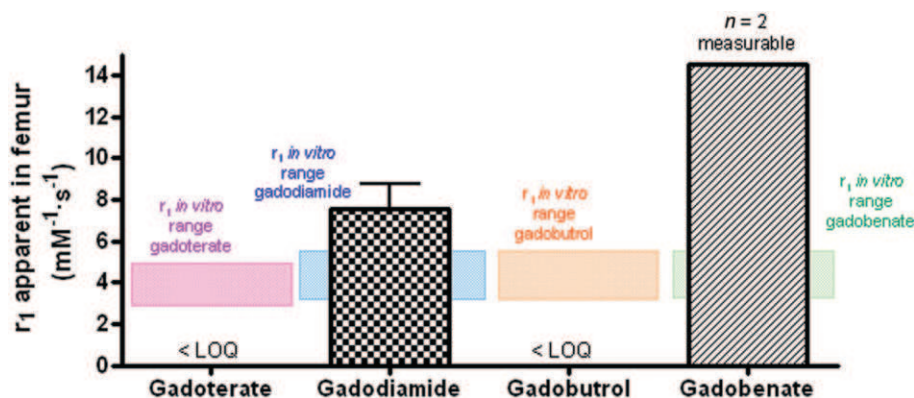


Figure 7

Relaxivity r_1 values (60 MHz, 37°C) in (trabecular) bone samples of SNx rats fed a high-phosphate diet treated with gadoterate, gadodiamide, gadobutrol or gadobenate on Day 25 (rat killed). LOQ indicates limit of quantification.

no signs of NSF (Marckmann *et al.*, 2007; Prince *et al.*, 2008). The main purpose of our study was to determine whether hyperphosphataemia is a cofactor or a risk factor of NSF as suggested by Peak and Sheller (2007).

The GC administration protocol used in our studies is similar to that used by other teams (Grant *et al.*, 2009; Pietsch *et al.*, 2009). Although the dose used was higher than the range 0.1 to 0.3 mmol.kg⁻¹ used for MRI contrast examination in clinical practice, it is appropriate for chronic studies in the rat because the comparative drug doses between species should be normalized to body surface area rather than body weight (US Food and Drugs Administration CfDEaR, 2005).

The SNx and high-phosphate diet rat model used in this study is classically used as a model of hyperparathyroidism (Sanchez *et al.*, 2004; Jiang and Wang, 2008) and bone lesions (Oste *et al.*, 2007). Both the bioavailability of phosphorus and the degree of renal failure are important parameters in the clinical relevance of the SNx rat model-associated osteodystrophy (Oste *et al.*, 2007). Phosphorus sources in the standard rat diet present a low bioavailability. However, the high-phosphate diet used in this study included inorganic Ca/P sources (monocalcium phosphate) with a high absorption rate, leading to a high bioavailability of phosphorus (Oste *et al.*, 2007).

In the first study, histological lesions consistent with those observed in NSF patients, including a haphazard arrangement of short and dense collagen bundles (Cowper *et al.*, 2008; Braverman and Cowper, 2010) were observed in SNx rats fed a high-phosphate diet and treated with gadodiamide. Multinucleated giant cells were observed, a feature sometimes reported in NSF patients (Wilford *et al.*, 2010). Gadodiamide-induced fibrosis-like lesions were more marked in SNx rats fed a high-phosphate diet than in SNx rats fed with normal diet. It has been shown (Fretellier *et al.*, 2011a) that no dermal fibrosis was observed up to 32 days after the first injection of gadodiamide, thus ruling out the possibility that high-phosphate diet may have accelerated the response. Epidermal lesions were also found in gadodiamide-treated SNx rats fed a high-phosphate diet. However, in rats, microscopic dermal abnormalities should be considered to be more clinically relevant than macroscopic epidermal lesions (e.g.

scabs). Thus, in addition to impaired renal function, hyperphosphataemia sensitizes the model. These data are therefore consistent with the role of hyperphosphataemia as a risk factor rather than a cofactor in NSF.

In the second study, all chemical categories of GCs and two polyazapoly-carboxylic ligands (calcium complexes of DOTA and DTPA) were compared on this 'sensitized', model of SNx rats fed a high-phosphate diet. Macroscopic (ulcerations and scabs) and histopathological skin lesions were only observed in gadodiamide-treated animals. The other categories of GCs, which are thermodynamically more stable (Port *et al.*, 2008), were not associated with macroscopic or microscopic skin lesions. Furthermore, no lesions were found with the two polyazapoly-carboxylic ligands tested, the macrocyclic Ca-DOTA and the linear Ca-DTPA. The daily dose of free ligand selected in this study was consistent with the dose of caldiumide (the free ligand added to the commercial solution of gadodiamide) used in another study (Sieber *et al.*, 2008a).

Bands of dermal inflammatory fibrosis were found in six of the eight gadodiamide-treated rats. Increased cellularity of the dermis was also observed. Interestingly, TGFβ₁ staining was observed on both dermal macrophages and spindle cells. Elevated tissue levels of TGFβ messenger RNA (mRNA) have been previously identified in NSF (Jiménez *et al.*, 2004). Also in another study, an increase in TGFβ protein and mRNA levels and Smad-2 and Smad-3 mRNA levels was reported (Schieren *et al.*, 2010). Positive immunostaining for TGFβ₁ was also demonstrated in NSF skin samples (Kelly *et al.*, 2008) as well as Smad-2 and -3 nuclear staining. These results suggest an association between TGFβ₁ and fibrosis in NSF. TGFβ₁ is a key mediator in fibrosis, as it induces fibroblasts to synthesize and contract the ECM (LeRoy *et al.*, 1990; Schiller *et al.*, 2004). Dermal CD34 expression is an important feature of NSF (Cowper *et al.*, 2008). It is noteworthy that moderate CD34 and S100A4 (i.e. fibroblast-specific protein-1) expression was observed in control biopsy samples. In human skin, CD34 has been demonstrated in vascular endothelial cells, in a subset of dendritic/spindle-shaped cells (Nickoloff, 1991), and in some skin tumours (Cohen *et al.*, 1997). The increased immunostaining of these markers, observed in gadodiamide-

treated rats, reflects the increased density of fibroblasts in the dermis. The CD34+ cells may represent recently migrated CD34+ fibrocytes (bone marrow-derived mesenchymal stem cells) (Bucala, 2008). Moreover, the possibility of CD34+ endothelial cells cannot be ruled out.

P-4-OH is an essential enzyme in collagen synthesis (Gorres and Raines, 2010). P-4-OH-positive foci were exclusively found in the dermis of gadodiamide-treated rats. This finding is consistent with that of another study (Haylor *et al.*, 2010) in which positive immunohistochemical staining for this enzyme was found after a single injection of gadodiamide in renally impaired rats.

Overall, the pathological features observed under these experimental conditions are compatible with those of NSF. However, no α -SMA staining was observed in our model, while α -SMA+ myofibroblasts have been reported in NSF lesions 3 to 4 weeks old (Swartz *et al.*, 2003; Cowper, 2007). However, it is noteworthy that in a recent study (Kelly *et al.*, 2010), NSF skin samples were negative for α -SMA. The same authors reported strong expression of TIMP-1 accompanied by almost absent expression of MMP-1. Another study reported increased levels of expression of both TIMP-1 mRNA and protein in skin samples from NSF patients (Schieren *et al.*, 2010). Under our experimental conditions, TIMP-1 immunostaining was detected on both dermal macrophages and spindle cells. TIMP-1 blocks the activation of MMP-1 (Matrisian, 1990), that plays a pivotal role in collagen degradation. Gadolinium chloride (Bhagavathula *et al.*, 2010) and gadodiamide (DaSilva *et al.*, 2010) have both been shown to stimulate MMP-1 and TIMP-1 production with no apparent increase in type I procollagen production in cultured human skin fibroblasts.

Renal dysfunction is the common predisposing factor of NSF (Cowper, 2007). Several clinical (Thakral *et al.*, 2007; Abraham *et al.*, 2008) and preclinical studies (Pietsch *et al.*, 2009 and Pietsch *et al.*, 2011; Sieber *et al.*, 2008a,b) have demonstrated that Gd may persist in tissues for long periods of time. In our study, no significant differences in plasma total Gd levels were observed in GC-treated rats, except in gadobenate-treated rats, in which lower plasma total Gd concentrations were observed at all time-points. Gadobenate is eliminated in urine and bile (Spinazzi *et al.*, 1999) with intense biliary excretion in rats (50% excretion rate 7 h after injection; Lorusso *et al.*, 1999). As the rats used in the present study were renally impaired, it is likely that biliary clearance of gadobenate was increased to compensate for renal impairment and that total clearance of this compound exceeded that of the other GCs tested (Ersoy and Rybicki, 2007).

The Gd concentrations found in the skin, femur and liver were higher in gadodiamide-treated rats than in the other GC-treated groups. No difference was observed between the two macrocyclic GCs tested, gadoterate and gadobutrol (except in the liver). These results are consistent with those of another study conducted in rats (Sieber *et al.*, 2008b). Preclinical data (Sieber *et al.*, 2008a,b; Pietsch *et al.*, 2009; Steger-Hartmann *et al.*, 2009; Pietsch *et al.*, 2011) are strongly suggestive of a causal role for dissociated Gd³⁺. *In vivo* dissociation of Gd³⁺ has been found in SNx rats treated with gadodiamide, while no such effect was observed with the macrocyclic GC gadoterate (Fretellier *et al.*, 2011b).

Our data are consistent with the gradual release of Gd from gadodiamide in tissues of treated rats, while no such

effect was found with the macrocyclic GCs gadoterate or gadobutrol. A dramatic increase in the r_1 value in liver samples was observed in rats treated with gadobenate. A possible explanation is that gadobenate binds to albumin. The r_1 relaxivity value at 20 MHz of the free contrast agent (without any binding to albumin) (r_1 free) is 4.5 mM⁻¹.s⁻¹ and the r_1 value of the non-covalently albumin-bound contrast agent (r_1 bound) is 36 mM⁻¹.s⁻¹ (Port *et al.*, 2005). However, in trabecular femur, the increase in the *in vivo* r_1 value was lower than that observed in liver tissue, but higher than that measured *in vitro* in bone matrix, suggesting a possible *in vivo* dissociation of gadobenate in bone tissue. The r_1 value at Day 25 (in skin and bone) could not be determined in 19/25 rats treated with gadobutrol, gadobenate or gadoterate because the $1/T1_{\text{sample}} - 1/T1_{\text{diamagnetic}}$ value was less than 20% of $1/T1_{\text{diamagnetic}}$ (low total Gd concentration in samples).

Hyperphosphataemia probably increases the risk of dissociation of linear GCs in biological milieu. Frenzel *et al.* (2008) showed that Gd³⁺ release rate for non-ionic linear GCs and the total amount released after 15 days were increased in human plasma at 37°C, following addition of 10 mM phosphate, while no effect was observed for macrocyclic GCs. The amount of Gd³⁺ released from gadobenate was substantially lower than that released from non-ionic linear GCs, but higher than that released from macrocyclic agents. Altogether, these results were consistent with the thermodynamic stability range of GCs (Port *et al.*, 2008).

It may be tempting to link the clinical sensitization of the SNx model associated with hyperphosphataemia, observed in Study 1, to phosphate-associated dissociation of gadodiamide and, subsequently, to a profibrosing effect of dissociated Gd. However, the protocol used in our study cannot provide any conclusions concerning this hypothesis, which would require demonstration of a correlation between skin dissociated Gd concentrations and pathological lesions (such as increased cellularity, and/or changes in ECM). However, while relaxometry can be used to detect dissociated states of Gd in solid tissues such as skin or bone, it cannot quantify this dissociation. HPLC-ICP-MS allows quantification of dissociated Gd³⁺ in plasma but cannot be used in solid tissues, in which it would be more pathophysiologically relevant. Therefore, the bioanalytical tools at the present time are unable to correlate dissociated Gd concentration and skin lesions.

The question of which Gd species is actually involved in the pathogenesis of the lesions observed remains unanswered. Several studies have demonstrated micron-sized insoluble deposits containing Gd associated with calcium and phosphate in NSF patients (Thakral and Abraham, 2009; George *et al.*, 2010). The protocol used in our study was unable to distinguish precipitated insoluble Gd in tissues. However, the presence of circulating soluble and probably protein-bound Gd was demonstrated in gadodiamide-treated rats. All states of Gd (i.e. dissociated and soluble, dissociated and precipitated and/or chelated) may be present in the samples. Gadolinium (in the form of GdCl₃) has been shown to promote fibroblast proliferation *in vitro* (Varani *et al.*, 2009; Bhagavathula *et al.*, 2010; Edward *et al.*, 2010), an effect associated with the formation of insoluble, Gd and phosphorous-containing aggregated particles (Li *et al.*, 2010).

The release of dissociated Gd from a GC must be estimated by taking into account both the thermodynamic and

kinetic stabilities (Idée *et al.*, 2009). It is speculated that, in the case of low thermodynamic stability but high kinetic stability, the timescale would be too long to reach a biologically significant Gd release in animals. Sensitization of NSF models should accelerate Gd dissociation in order to induce clinically relevant lesions. In our study, hyperphosphataemia sensitized SNx rats to gadodiamide. This is consistent with Frenzel's data showing a phosphate-related dissociation of linear GCs. Nevertheless, in the case of 'intermediate' molecules (i.e. poor thermodynamic stability but high kinetic stability, such as gadobutrol), additional sensitization may be needed to shorten the timescale in order to evaluate their safety under more discriminative conditions.

In conclusion, hyperphosphataemia sensitizes the effects of the linear, non-ionic GC gadodiamide in renally impaired rats. This GC appears to be the most toxic of the commercially available GCs. Further studies are warranted to better understand the mechanism of NSF and the role of hyperphosphataemia as a risk factor.

Acknowledgements

The authors thank Drs Anthony Saul and Dominique Debeze-Henderson for reviewing the English version of the manuscript.

Conflicts of interest

All work was funded by Guerbet. NF, JMI, GJ, CF, NP, AD, NB, MP and CC are or were employees of Guerbet.

References

- Abraham JL, Thakral C, Skov L, Rossen K, Marckmann P (2008). Dermal inorganic gadolinium concentrations: evidence for in vivo transmetallation and long-term persistence in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol* 158: 273–280.
- Bhagavathula N, Dame MK, Dasilva M, Jenkins W, Aslam MN, Perone P *et al.* (2010). Fibroblast response to gadolinium: role for platelet-derived growth factor receptor. *Invest Radiol* 45: 769–777.
- Braverman IM, Cowper SE (2010). Nephrogenic systemic fibrosis. *F1000 Med Rep* 2: 84.
- Broome DR (2008). Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: a summary of the medical literature reporting. *Eur J Radiol* 66: 230–234.
- Bucala R (2008). Circulating fibrocytes: cellular basis for NSF. *J Am Coll Radiol* 5: 36–39.
- Cohen PR, Rapini RP, Farhood AI (1997). Dermatopathologic advances in clinical research. The expression of antibody to CD34 in mucocutaneous lesions. *off. Dermatol Clin* 15: 159–176.
- Coladonato JA (2005). Control of hyperphosphataemia among patients with ESRD. *J Am Soc Nephrol* 16 (Suppl. 2): 107–114.
- Cowper SE (2007). Nephrogenic systemic fibrosis: a review and exploration of the role of gadolinium. *Adv Dermatol* 23: 131–154.
- Cowper SE, Su LD, Bhawan J, Robin HS, LeBoit PE (2001). Nephrogenic fibrosing dermatopathy. *Am J Dermatopathol* 23: 383–393.
- Cowper SE, Rabach R, Girardi M (2008). Clinical and histological findings in nephrogenic systemic fibrosis. *Eur J Radiol* 66: 191–199.
- Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, Maronpot RR, Prater DA, Riley JH *et al.* (2004). Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicol Pathol* 32: 126–131.
- DaSilva M, Deming MO, Fligel SE, Dame MK, Johnson KJ, Swartz RD *et al.* (2010). Responses of human skin in organ culture and human skin fibroblasts to a gadolinium-based MRI contrast agent: comparison of skin from patients with end-stage renal disease and skin from healthy subjects. *Invest Radiol* 45: 733–739.
- Edward M, Quinn JA, Burden AD, Newton BB, Jardine AG (2010). Effect of different classes of gadolinium-based contrast agents on control and nephrogenic systemic fibrosis-derived fibroblast proliferation. *Radiology* 256: 735–743.
- Ersoy H, Rybicki FJ (2007). Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J Magn Reson Imaging* 26: 1190–1197.
- Frenzel T, Lengsfeld P, Schirmer H, Hütter J, Weinmann HJ (2008). Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37°C. *Invest Radiol* 73: 817–828.
- Fretellier N, Idée JM, Guerret S, Hollenbeck C, Hartmann D, González W *et al.* (2011a). Clinical, biological, and skin histopathological effects of ionic macrocyclic and nonionic linear gadolinium chelates in a rat model of nephrogenic systemic fibrosis. *Invest Radiol* 46: 85–93.
- Fretellier N, Idée JM, Dencausse A, Karroum O, Guerret S, Poveda N *et al.* (2011b). comparative in vivo dissociation of gadolinium chelates in renally impaired rats: a relaxometry study. *Invest Radiol* 46: 292–300.
- George SJ, Webb SM, Abraham JL, Cramer SP (2010). Synchrotron X-ray analyses demonstrate phosphate-bound gadolinium in skin in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol* 163: 1077–1081.
- Gorres KL, Raines RT (2010). Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 106–124.
- Grant D, Johnsen H, Juelsrud A, Løvhaug D (2009). Effects of gadolinium contrast agents in naïve and nephrectomised rats: relevance to nephrogenic systemic fibrosis. *Acta Radiol* 50: 156–169.
- Grobner T (2006). Gadolinium: a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermatopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant* 21: 1104–1108.
- Haylor J, Dencausse A, Vickers M, Nutter F, Jestin G, Slater D *et al.* (2010). Nephrogenic gadolinium biodistribution and skin cellularity following a single injection of Omniscan in the rat. *Invest Radiol* 45: 507–512.
- Idée JM, Port M, Robic C, Medina C, Sabatou M, Corot C (2009). Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *J Magn Reson Imaging* 30: 1249–1258.
- Jiang Y, Wang M (2008). Hyperphosphataemia-induced hyperparathyroidism in 5/6 nephrectomized rats: development of a new animal model. *Chin Med J* 121: 2440–2443.
- Jiménez SA, Artlett CM, Sandorfi N, Derk C, Latinis K, Sawaya H *et al.* (2004). Dialysis-associated systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermatopathy): study of inflammatory cells and transforming growth factor beta1 expression in affected skin. *Arthritis Rheum* 50: 2660–2666.

- Kelly B, Pettitt M, Sanchez R (2008). Nephrogenic systemic fibrosis is associated with transforming growth factor beta and Smad without evidence of renin-angiotensin system involvement. *J Am Acad Dermatol* 58: 1025–1030.
- Kelly BC, Markle LS, Vickers JL, Pettitt MS, Raimer SS, McNeese C (2010). The imbalanced expression of matrix metalloproteinases in nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Acad Dermatol* 63: 483–489.
- LeRoy EC, Trojanowska MI, Smith EA (1990). Cytokines and human fibrosis. *Eur Cytokine Netw* 1: 215–219.
- Li JX, Liu JC, Wang K, Yang XG (2010). Gadolinium-containing bioparticles as active antity to promote cell cycle progression in mouse embryo fibroblast NIH3T3 cells. *J Biol Inorg Chem* 15: 547–557.
- Lorusso V, Arbughi T, Tirone P, de Haën C (1999). Pharmacokinetics and tissue distribution in animals of gadobenate ion, the magnetic resonance imaging contrast enhancing component of gadobenate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance). *J Comput Assist Tomogr* 23 (Suppl. 1): 181–194.
- Mahl A, Heining P, Ulrich P, Jakubowski J, Bobadilla M, Zeller W *et al.* (2000). Comparison of clinical pathology parameters with two different blood sampling techniques in rats: retrobulbar plexus versus sublingual vein. *Lab Anim* 34: 351–361.
- Marckmann P, Skov L, Rossen K, Heaf JG, Thomsen HS (2007). Case-control study of gadodiamide-related nephrogenic systemic fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 22: 3174–3178.
- Matrisian LM (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6: 121–125.
- Nickoloff BJ (1991). The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol* 127: 523–529.
- Oste L, Behets GJ, Dams G, Bervoets AR, Marynissen RL, Geryl H *et al.* (2007). Role of dietary phosphorus and degree of uremia in the development of renal bone disease in rats. *Ren Fail* 29: 1–12.
- Peak A, Sheller A (2007). Risk factors for developing gadolinium-induced nephrogenic systemic fibrosis. *Ann Pharmacother* 41: 1481–1485.
- Perazella MA, Reilly RF (2011). Imaging patients with kidney disease: how do we approach contrast-related toxicity? *Am J Med Sci* 341: 215–221.
- Pietsch H, Lengsfeld P, Steger-Hartmann T, Löwe A, Frenzel T, Hütter J *et al.* (2009). Impact of renal impairment on long-term retention of gadolinium in the rodent skin following the administration of gadolinium-based contrast agents. *Invest Radiol* 44: 226–233.
- Pietsch H, Raschke M, Ellinger-Ziegelbauer H, Jost G, Walter J, Frenzel T *et al.* (2011). The role of residual gadolinium in the induction of nephrogenic systemic fibrosis-like skin lesions in rats. *Invest Radiol* 46: 48–56.
- Port M, Corot C, Violas X, Robert P, Raynal I, Gagneur G (2005). How to compare the efficiency of albumin-bound and nonalbumin-bound contrast agents in vivo: the concept of dynamic relaxivity. *Invest Radiol* 40: 565–573.
- Port M, Idée JM, Medina C, Robic C, Sabatou M, Corot C (2008). Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biomaterials* 21: 469–490.
- Prince MR, Zhang H, Morris M, MacGregor JL, Grossman ME, Silberzweig J *et al.* (2008). Incidence of nephrogenic systemic fibrosis at two large medical centers. *Radiology* 248: 807–816.
- Sanchez CP, He YZ, Leiferman E, Wilsman NJ (2004). Bone elongation in rats with renal failure and mild or advanced secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 65: 1740–1748.
- Schieren G, Gambichler T, Skrygan M, Burkert B, Altmeyer P, Rump LC *et al.* (2010). Balance of profibrotic and antifibrotic [corrected] signaling in nephrogenic systemic fibrosis skin lesions. *Am J Kidney Dis* 55: 1040–1049.
- Schiller M, Javelaud D, Mauviel A (2004). TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 35: 83–92.
- Sieber MA, Pietsch H, Walter J, Haider W, Frenzel T, Weinmann HJ (2008a). A preclinical study to investigate the development of nephrogenic systemic fibrosis: a possible role for gadolinium-based contrast media. *Invest Radiol* 43: 65–75.
- Sieber MA, Lengsfeld P, Frenzel T, Golfier S, Schmitt-Willich H, Siegmund F *et al.* (2008b). Preclinical investigation to compare different gadolinium-based contrast agents regarding the propensity to release gadolinium in vivo and to trigger nephrogenic systemic fibrosis-like lesions. *Eur Radiol* 18: 2164–2173.
- Spinazzi A, Lorusso V, Pirovano G, Kirchin M (1999). Safety, tolerance, biodistribution, and MR imaging enhancement of the liver with gadobenate dimeglumine: results of clinical pharmacologic and pilot imaging studies in nonpatient and patient volunteers. *Acad Radiol* 6: 282–291.
- Steger-Hartmann T, Raschke M, Riefke B, Pietsch H, Sieber MA, Walter J (2009). The involvement of pro-inflammatory cytokines in nephrogenic systemic fibrosis. A mechanistic hypothesis based on preclinical results from a rat model treated with gadodiamide. *Exp Toxicol Pathol* 61: 537–552.
- Swartz RD, Crofford LJ, Phan SH, Ike RW, Su LD (2003). Nephrogenic fibrosing dermatopathy: a novel cutaneous fibrosing disorder in patients with renal failure. *Am J Med* 114: 563–572.
- Thakral C, Abraham JL (2009). Gadolinium-induced nephrogenic systemic fibrosis is associated with insoluble Gd deposits in tissues: in vivo transmetallation confirmed by microanalysis. *J Cutan Pathol* 36: 1244–1254.
- Thakral C, Alhariri J, Abraham JL (2007). Long-term retention of gadolinium in tissues from nephrogenic systemic fibrosis patient after multiple gadolinium-enhanced MRI scans: case report and implications. *Contrast Media Mol Imaging* 2: 199–205.
- US Food and Drugs Administration CfDEaR (2005). Guidance for industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf%202005:1-27> (last accessed 29 March 2011).
- Vakil V, Sung JJ, Piecychna M, Crawford JR, Kuo P, Abu Alfa AK *et al.* (2009). Gadolinium-containing magnetic resonance image contrast agents promotes fibrocytes differentiation. *J Magn Reson Imaging* 20: 1284–1288.
- Varani J, DaSilva M, Warner RL, Deming MO, Barron AG, Johnson KJ (2009). Effects of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents on human skin in organ culture and human skin fibroblasts. *Invest Radiol* 44: 74–81.
- Wilford C, Fine JD, Boyd AS, Sanyal S, Abraham JL, Kantrow SM (2010). Nephrogenic systemic fibrosis: report of an additional case with granulomatous inflammation. *Am J Dermatopathol* 32: 71–75.

6.2.2 Résultats et discussion

L'objectif principal de notre étude était de documenter le **rôle de l'hyperphosphatémie** afin de déterminer s'il s'agit d'un facteur associé ou d'un facteur de risque de la FSN.

L'administration d'une alimentation enrichie en phosphate induit une **hyperphosphatémie** chez des rats néphrectomisés des 5/6^e. Nous avons également observé des lésions osseuses (diminutions de la minéralisation osseuse, de la densité de la moelle osseuse, de l'ostéoïde et apparition de structures fibreuses) chez ces animaux. Ce modèle mime la forme la plus courante d'ostéodystrophie clinique : **l'ostéite fibreuse** (Coladonato, 2005). Notre modèle semble donc cliniquement pertinent puisqu'il associe une **insuffisance rénale**, une **hyperphosphatémie** et une **ostéodystrophie**.

Des **lésions épidermiques** ont été observées chez 4 des 7 rats ayant reçu le gadodiamide et une alimentation enrichie en phosphate alors qu'aucun animal n'a présenté des lésions cutanées après administration de gadodiamide chez les rats normophosphatémiques. De plus, des lésions importantes de type **fibrose** (désorganisation du collagène, fibres de collagène épaissies, foyers inflammatoires, nécrotiques et une augmentation de la cellularité du derme) ont été notées dans ce groupe. Les cellules exprimant TGF β , un marqueur clé et central de la fibrose, sont nombreuses dans le derme des rats hyperphosphatémiques recevant le gadodiamide alors qu'aucune modification n'a été observée dans le groupe normophosphatémiq. Ceci suggère un **effet sensibilisant de l'hyperphosphatémie**.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé les effets de toutes les catégories moléculaires de CGs et de deux complexes de calcium chez des rats insuffisants rénaux et hyperphosphatémiques. Des **lésions cutanées histologiques et macroscopiques** ont été observées **uniquement** après administration de **gadodiamide**. Une **fibrose inflammatoire** associée à une **hypercellularité** du derme a été notée chez 6 rats sur 8. L'expression du marqueur de la fibrose **TGF β** et celle de **TIMP-1** (un inhibiteur d'une métalloprotéinase collagénolytique, MMP1) sont également augmentées dans le derme de ces animaux, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus chez des patients souffrant de FSN (Jiménez et coll., 2004 ; Kelly et coll., 2008 ; Kelly et coll., 2010 ; Schieren et coll., 2010). L'expression de la **prolyl-4-hydroxylase**, une enzyme impliquée dans la synthèse des fibres de collagène (voir notamment la section 1.2.4 La prolyl 4-hydroxylase), est aussi augmentée. Ces résultats suggèrent la présence accentuée de collagène (inhibition de sa dégradation et synthèse de nouveau collagène) dans le derme des rats ayant reçu du gadodiamide. Cependant, pour des raisons techniques, nous n'avons pas quantifié le collagène dans la peau des rats.

La présence de macrophages (marquage ED-1 [CD68]) a aussi été augmentée chez ces animaux, ce qui indique la présence d'une inflammation.

La tolérance des deux complexes de calcium a été excellente.

Nos travaux montrent une **rétenion tissulaire de Gd total supérieure** chez les rats ayant reçu le gadodiamide par rapport à ceux ayant reçu l'acide gadobénique et les CGs macrocycliques, ce qui est cohérent avec la littérature (Sieber et coll., 2008b). Nous avons aussi noté, chez ces animaux, une libération de **Gd³⁺ dissocié** dans le plasma et une **augmentation** de la constante de **relaxivité** r_1 , ce qui suggère une **dissociation du gadodiamide *in vivo***. Au contraire, les CGs macrocycliques sont restés stables *in vivo*. Ces données sont en accord avec nos résultats précédents (Fretellier et coll. 2011b).

La forte augmentation de la valeur de la constante de relaxivité r_1 observée dans le foie des rats ayant reçu l'acide gadobénique peut s'expliquer par une liaison à l'albumine car la relaxivité r_1 obtenue dans ce tissu est équivalente à celle de l'acide gadobénique lié à l'albumine (Port et coll., 2005). En revanche, l'augmentation de la valeur de r_1 dans le fémur chez deux animaux est plus faible que celle observée dans le foie mais supérieure à la valeur de référence r_1 *in vitro* (sur la matrice osseuse), ce qui peut suggérer une dissociation de l'acide gadobénique dans le tissu osseux.

Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un sel insoluble de Gd au niveau tissulaire, comme cela a pu être décrit dans la peau de patients souffrant de FSN (Thakral et Abraham, 2009 ; George et coll., 2010). En fait, la relaxométrie nous a permis de détecter la présence de Gd³⁺ dissocié sous forme soluble car nous avons observé une augmentation de relaxivité. Néanmoins, ce résultat n'est pas incompatible avec la présence d'autres formes de Gd (complexée, dissocié et insoluble).

L'**hyperphosphatémie** semble donc être un **facteur de risque** de la FSN puisqu'il sensibilise des rats insuffisants rénaux aux effets profibrosants du gadodiamide. Notre étude confirme la toxicité de ce CG (lésions cutanées, accumulation tissulaire de Gd et dissociation *in vivo*). Ces données sont cliniquement pertinentes. En effet, la majorité des cas cliniques de FSN est associée à l'administration de ce produit (Bennett et coll., 2012).

6.3 Modèle d'insuffisance rénale par ajout d'adénine dans l'alimentation

6.3.1 Rôle du degré de l'insuffisance rénale et comparaison des CGs (Article 4)

6.3.1.1 Rationnelle

Il est important de disposer de modèles expérimentaux **simples, discriminants** et **cliniquement pertinents** de la FSN afin de mieux comprendre le mécanisme de cette pathologie et d'évaluer les CGs commercialisés ou à venir.

Notre modèle d'insuffisance rénale associée à une hyperphosphatémie (néphrectomie des 5/6^e et alimentation enrichie en phosphate) a permis l'obtention de données très intéressantes, que nous avons décrites précédemment. Cependant, il présente un certain nombre d'inconvénients :

- La nécessité d'une intervention chirurgicale lourde réalisée au préalable chez l'éleveur et, par conséquent, une fragilité des animaux ;
- Une réduction de la fonction rénale relativement limitée (réduction de la clairance de la créatinine d'environ 60 %, contre 70 à 80 % avec le protocole chirurgical en deux phases). Une étude récente (Haylor et coll., 2010) a montré que l'hypercellularité du derme est d'autant plus importante que l'insuffisance rénale est sévère après administration de gadodiamide ;
- Un coût élevé des animaux ;
- Dans notre modèle préalablement décrit, une alimentation enrichie en phosphate est administré aux femelles gestantes. La mise en place du modèle est donc longue (au minimum 8 semaines) ;
- Aucune discrimination des CGs de stabilités intermédiaires n'a été observée.

Il nous est donc apparu judicieux de mettre au point **un autre modèle animal sensibilisé de FSN**.

Pour être proche des conditions cliniques, il était essentiel de travailler chez des rats insuffisants rénaux. Des travaux ont montré que l'ajout d'adénine à la nourriture standard induit une insuffisance rénale pouvant être importante (Katsumata et coll., 2003 ; Pasch et coll., 2008). De plus, dans ce modèle, l'insuffisance rénale est associée à une hyperphosphatémie (Katsumata et coll., 2003), dont nous savons qu'elle est liée à la survenue de FSN chez des insuffisants rénaux (Marckmann et coll. 2007 ; Prince et coll., 2008), qu'elle a un effet sensibilisant aux effets du gadodiamide *in vivo* (Fretellier et coll., 2012) et à la dissociation des CGs linéaires *in vitro* (Frenzel et coll., 2008). Par conséquent, ce modèle d'insuffisance rénale chez le Rat nous a semblé non seulement pertinent au plan clinique, mais aussi plus simple, plus économique, plus rapide et adapté à notre objectif. Enfin, ce modèle présente l'avantage de permettre la modulation du degré de l'insuffisance rénale, en faisant varier la durée du régime enrichi en adénine.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé ce modèle d'insuffisance rénale par le suivi temporel de la fonction rénale et des constantes hématologiques et biochimiques.

Par la suite, nous avons étudié le rôle du degré d'insuffisance rénale chez des animaux recevant du gadodiamide. Pour cela, les rats ont reçu une alimentation enrichie en adénine (0,75%) pendant 8, 14, ou 16 jours consécutifs. Le gadodiamide a été administré durant la 2^e semaine (J7 à J11) ou durant la 3^e semaine (J14 à J18) dans le protocole dit « sévère ».

Enfin, nous avons comparé le profil de tolérance et l'éventuelle dissociation *in vivo* de toutes les catégories de CGs commercialisés sur ce nouveau modèle sensibilisé (modèle d'insuffisance rénale le plus sévère). Nous avons posé l'hypothèse que la très faible fonction rénale subsistante peut permettre de discriminer les CGs de stabilité intermédiaire.

Ces travaux ont donné lieu à la publication suivante (Article 4) :

Fretellier N, Bouzian N, Parmentier N, Bruneval P, Jestin G, Factor C, Mandet C, Daubiné F, Massicot F, Laprèvote O, Hollenbeck C, Port M, Idée JM, Corot C. Nephrogenic systemic fibrosis-like effects of magnetic resonance imaging contrast agents in rats with adenine-induced renal failure. *Toxicol Sci.* 2013; 131: 259-270.

Nephrogenic Systemic Fibrosis-Like Effects of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Rats with Adenine-Induced Renal Failure

Nathalie Fretellier,^{*,†,1} Nejma Bouzian,^{*} Nadège Parmentier,^{*} Patrick Bruneval,^{‡,§} Gaëlle Jestin,^{*} Cécile Factor,^{*} Chantal Mandet,[‡] Florence Daubiné,[¶] France Massicot,[†] Olivier Laprèvote,^{†,||} Claire Hollenbeck,^{*} Marc Port,^{*} Jean-Marc Idée,^{*} and Claire Corot^{*}

^{*}Research Division, Guerbet, Roissy Charles de Gaulle Cedex, France; [†]Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; [‡]Department of Pathology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; [§]INSERM U970, Department of Pathology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; [¶]Atlantic Bone Screen, Nantes, France; and ^{||}Service de Toxicologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Paris, France

¹To whom correspondence should be addressed at Research Division, Guerbet, BP 57400, Roissy Charles de Gaulle 95943, France. Fax: +33 1 45 91 51 23. E-mail: nathalie.fretellier@guerbet-group.com.

Received July 18, 2012; accepted September 3, 2012

Nephrogenic systemic fibrosis (NSF) is a scleroderma-like disease associated with prior administration of certain gadolinium chelates (GCs). NSF occurs in patients with severe renal failure. The purpose of this study was to set up a rat model of GC-associated NSF to elucidate the mechanism of this devastating disease. Firstly, after characterization of the model, male Wistar rats received a 0.75% adenine-enriched diet for 8, 14, or 16 days to obtain various degrees of renal failure. Rats received five consecutive daily iv injections of saline or gadodiamide (2.5 mmol/kg/day). Secondly, the safety profile and *in vivo* propensity to dissociate of all categories of marketed GCs (gadoterate, gadobutrol, gadobenate, gadopentetate, and gadodiamide) were compared in rats receiving adenine-enriched diet for 16 days. Serial skin biopsies were performed for blinded histopathological study. Total Gd concentration in tissues was measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Relaxometry was used to evaluate the presence of dissociated Gd in skin and bone. Gadodiamide-induced high mortality and skin lesions (dermal fibrosis, calcification, and inflammation) were related to adenine diet duration. No skin lesions were observed with other molecules. Unlike macrocyclic GCs, gadodiamide, gadopentetate, and gadobenate gradually increased the r_1 relaxivity value, consistent with *in vivo* dissociation and release of soluble Gd (or, in the case of gadobenate, the consequence of protein binding). Gadodiamide-induced cutaneous and systemic toxicity depended on baseline renal function. We demonstrate *in vivo* dissociation of linear GCs, gadodiamide, and gadopentetate, whereas macrocyclic agents remained stable over the study period.

Key Words: nephrogenic systemic fibrosis; renal impairment; relaxometry; gadolinium; magnetic resonance imaging; contrast agents.

Nephrogenic systemic fibrosis (NSF) is a rare but serious systemic disease associated with prior administration of certain

gadolinium chelates (GCs) used as magnetic resonance imaging contrast agents. This disease has been shown to occur in patients with severe or end-stage renal disease (ESRD) (Cowper *et al.*, 2008). Skin involvement (thickening and hardening of the skin associated with plaques, papules, and nodules) is the first sign of the disease. Patients often report pain, associated with pruritus, paraesthesia, and burning (Cowper *et al.*, 2008). Histologically, NSF is characterized by increased dermal cellularity, expression of CD34-positive cells with prominent collagen bundles, presence of spindle cells, septal involvement, and sometimes osseous metaplasia (Cowper *et al.*, 2008). No single diagnostic test is available for NSF. However, a working definition including a consensus scoring system has recently been published (Girardi *et al.*, 2011). This definition should serve as a working diagnostic standard and the basis for adjudicating borderline cases. Several authors have reported the involvement of many organ systems referring to the “systemic” aspect of the disease, which can eventually lead to death (Galan *et al.*, 2006).

The recent recognition of a link between GCs and the development of NSF (Grobner, 2006) has revived the long-debated issue of the relevance of the thermodynamic stability of these agents (Morcos, 2008). In order to be used as contrast agents, the lanthanide element gadolinium must first be chelated with a polyaza-polycarboxylic ligand due to its intrinsic toxicity (Idée *et al.*, 2008). Two structurally distinct categories of GCs are currently marketed, according to the structure of the ligand: (1) “macrocyclic” chelates (e.g., gadoterate or gadobutrol) in which Gd³⁺ ions are caged into a cavity of the ligand and (2) “linear”, open-chain chelates (e.g., gadopentetate, gadobenate, or gadodiamide). GC can also be either “nonionic” (where the number of carboxyl groups is reduced to 3, thereby neutralizing the 3 positive charges of Gd³⁺) or “ionic” (Port *et al.*, 2008). GCs dramatically differ in terms of their thermodynamic

molecular stability. High kinetic stability (i.e., low dissociation rate over time) provided by the macrocyclic structure combined with high thermodynamic stability minimize the amount of free Gd^{3+} that can be gradually released from the parent chelate (Port *et al.*, 2008). For lower stability GCs, excess free ligand is included in the pharmaceutical preparation to reduce possible release of Gd^{3+} during shelf life (Port *et al.*, 2008). The vast majority of published cases of NSF were associated with the nonionic, linear GC gadodiamide and the ionic, less linear GC gadopentetate (Rodby, 2011).

One of the numerous hypotheses for the mechanism of NSF is that dissociation of less stable GC in at-risk patients may lead to gradual release of the free gadolinium ion Gd^{3+} , which may subsequently activate trafficking of circulating CD34+ fibrocytes and/or directly activate resident fibroblasts (Idée *et al.*, 2008). *In vitro* proliferative effects of gadolinium have been described (Li *et al.*, 2010). An alternative hypothesis is a profibrotic effect of the GC molecule itself (Newton and Jiménez, 2009). Various rat models of NSF have been proposed to elucidate the mechanism of this disease (Sieber *et al.*, 2009). The most common model consists of the administration of GCs in subtotally (five sixth) nephrectomized rats (five-sixth SNx) (Fretellier *et al.*, 2011a; Grant *et al.*, 2009; Haylor *et al.*, 2010; Pietsch *et al.*, 2009). Overall, these studies concluded that fibrotic-like lesions can be induced in rats treated with gadodiamide. Gadodiamide has also been shown to increase Gd retention in rats, with a higher skin gadolinium concentration in rats receiving gadodiamide compared with animals receiving gadopentetate. The lowest values were observed in rats treated with macrocyclic GCs. However, this interesting and validated model presents certain disadvantages such as cost, limited reduction of glomerular filtration rate (GFR), and absence of hyperphosphatemia. Addition of adenine to the diet of rat has been reported to induce renal failure (Koeda *et al.*, 1988). This model has several potential advantages over the five-sixth SNx model (high reproducibility, hyperphosphatemia, and early drop in GFR with potentially adjustable amplitude).

To our knowledge, no study has compared all marketed categories of GCs in a sensitized (renally impaired) *in vivo* model. This model would therefore appear to be of great interest. The aim of this study was to (1) characterize this new rat model of NSF, (2) investigate the role of baseline function in rats receiving the nonionic linear GC gadodiamide, and (3) compare the safety profile and *in vivo* propensity to dissociate of all categories of marketed GCs.

MATERIALS AND METHODS

Animals

A total of 84 male Wistar rats (Centre d'Élevage René Janvier, CERJ, Le Genest Saint Isle, France), aged 6 weeks, and weighing 285 ± 39 g at the time of the study were used. The animals were housed two per cage at an ambient temperature of $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, hygrometry of $45 \pm 10\%$, with 12/12-h light/dark cycles. Rats were given *ad libitum* access to water and food (A04, SAFE, Augy,

France) for 10 days of acclimatization before starting the experiments. At the start of the study (day 0), animals were given a diet containing 0.75% adenine (SAFE). Rats were housed individually from 1 week after the beginning of the study. All experimental procedures were performed in accordance with French regulations and in compliance with the European Economic Community Directive (2010/63/EU) on animal welfare.

Characterization of the Adenine Rat Model

Seven rats received 0.75% adenine-enriched diet for 4 weeks and were then fed a standard diet (A04) for another 3 weeks. Five rats (normal control group) were fed a normal diet. The animals were euthanized (exsanguination under isoflurane anesthesia) at the end of the experiment (i.e., on day 49 after the start of adenine diet). Blood (from sublingual vein) and 24-h urine samples were collected once or twice a week (days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, and 49). Blood was used for routine hematological examinations using a MS4-5 automat (Melet-Schloesing, Osny, France). Plasma levels of total calcium, phosphorus, transferrin-bound iron, creatinine (Vitros-II auto-analyzer), sodium, chloride, and potassium (direct potentiometry, Vitros-350 autoanalyzer, Ortho-Clinical Diagnostics Inc., Issy les Moulineaux, France) were also measured. Urine levels of creatinine were determined using a Vitros-II analyzer. Creatinine clearance (ml/min/100 g bw) was calculated by a standard method.

At necropsy, kidneys and femurs were removed and fixed in 4% neutral buffered formalin. After dehydration, the femurs were embedded in glycol methacrylate resin, sectioned (4–6 μm thick), and stained with Von Kossa (mineralized bone structure) and Goldner's Trichrome (osteoid, bone marrow, and bone structure) stains. After routine dehydration, the kidneys were embedded in paraffin, sectioned (5 μm thickness), and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) for histological examination. Histopathological examinations were performed in a blinded fashion in accordance with the Society of Toxicologic Pathology guidelines (Crissman *et al.*, 2004).

Role of Baseline Renal Function on the Clinical and Biochemical Effects of Gadodiamide

Study design. Based on the duration of the adenine diet, three levels of renal impairment were tested. Rats received 0.75% adenine-enriched diet for either 8 (study 1), 14 (study 2), or 16 (study 3) days ($n = 4\text{--}11$ rats per group). Rats were allocated to five consecutive daily iv injections (into the tail vein) of 0.5 (study 1) or 2.5 mmol/kg (studies 1, 2, and 3) of gadodiamide (Omniscan, GE Healthcare, Batch 11082864 in studies 1 and 3; Batch 10755384 in study 2) or saline from day 7 to 11 (studies 1 and 2) or from day 14 to 18 (study 3) (Fig. 1). Blood samples were collected for determination of hematological and biochemical parameters on day 0, the first day of gadodiamide treatment and at sacrifice. Skin biopsies were performed on the 1st and 8th (study 2) or 10th (studies 1 and 3) days of gadodiamide treatment and at sacrifice. Rats were euthanized 3 weeks after the last injection of gadodiamide or saline (corresponding to day 32 in studies 1 and 2; day 39 in study 3), and skin, the left kidney, and liver were removed.

Rats were checked for macroscopic skin changes before the first injection and then daily throughout the study. On the 8th or 10th day of treatment and at sacrifice, the animals' backs were carefully shaved to facilitate visualization of potential lesions.

Histopathological examinations. Skin, kidney, and liver samples were fixed in 4% neutral buffered formalin. After dehydration, samples were embedded in paraffin, sectioned (5 μm thickness), and stained with HES stain for histological examination. Immunohistochemistry was performed on skin samples at sacrifice in studies 2 and 3. Transforming growth factor β_1 (TGF β_1), a fibrotic marker, was detected using anti-TGF β_1 mouse antibody (AbD Serotec, Colmar, France) and ED-1-positive macrophages (AbD Serotec) were detected using anti-ED-1 mouse antibody and an antimouse biotinylated antibody (AbCys, Paris, France) staining. Histopathological examinations were performed, in blinded fashion, by a certified pathologist.

Biochemistry and hematology. Hematological parameters were determined with a MS4-5 automat. Plasma levels of total calcium, phosphorus, blood urea nitrogen (BUN), iron (Vitros DT60II, Ortho-Clinical Diagnostics,

RESULTS

Characterization of the Adenine Rat Model

Clinical findings, weight, biochemistry, and hematology. A decrease in body weight was observed in the group receiving adenine diet compared with the control group over the adenine diet period (202.7 ± 22.1 g vs. 432.3 ± 17.1 g, $p < 0.05$ on day 28). An abrupt decrease in creatinine clearance was observed in adenine-fed rats from the first week of the adenine period and creatinine clearance then remained stable until the end of the study (Fig. 2). A gradually increasing high mortality was observed in the adenine-fed group from the third week of adenine diet onwards (Fig. 2). An increase in plasma phosphorus (peak value on day 21: 4.1 ± 1.0 vs. 2.4 ± 0.2 mmol/l in controls, $p < 0.01$) associated with a decrease in plasma total calcium (peak value on day 28: 2.0 ± 0.1 mmol/l vs. 2.5 ± 0.2 mmol/l in controls, $p < 0.05$) was observed during the adenine period. An increase in urinary total proteins was observed in adenine-fed rats (peak value on day 7: 523 ± 144 mg/l vs. 12 ± 4 mg/l in controls, $p < 0.01$). At necropsy, kidneys of adenine-treated rats were pale and hypertrophied with a higher mean weight than that of kidneys from control rats (1.0 ± 0.05 g/100 g bw vs. 0.29 ± 0.01 g/100 g bw, $p < 0.05$).

Histopathology of kidneys and femurs. Adenine induced major tubular lesions with intratubular lithiasis-like precipitates and renal interstitial fibrosis with few inflammatory cells (HES) and no glomerular and vascular changes (Fig. 3A). A marked decrease in bone tissue mineralization in femoral epiphyses and/or diaphyseal bone-degrading cell infiltrate was observed in adenine-fed rats (Von Kossa's stain) (Fig. 3B). These lesions were associated with a marked decrease in bone marrow density (Goldner's Trichrome). Fibrous structures were observed in bone marrow of adenine-fed rats (Fig. 3C).

Role of Baseline Renal Function on the Clinical and Biochemical Effects of Gadodiamide

Clinical findings and biochemistry. On day 0 (i.e., before adenine diet), mean plasma creatinine was 20.9 ± 3.7 μ mol/l. On the first day of gadodiamide administration, plasma creatinine was equivalent in studies 1 and 2, but was higher in study 3 ($p < 0.001$ vs. studies 1 and 2) (Table 1). At sacrifice, plasma creatinine was lower in study 1 than in studies 2 and 3 ($p < 0.05$). A decrease in plasma creatinine compared with the first day of gadodiamide was observed at sacrifice in studies 1 and 3, but remained stable in study 2.

On the first day of gadodiamide treatment, the severity of renal failure estimated by BUN was consistent with that estimated by plasma creatinine (Table 1). BUN at sacrifice was not a reliable parameter, as the duration of standard diet differed between the three studies, and this difference may have interfered with BUN levels.

Gadodiamide administration was associated with high mortality (10/11 rats) in rats in study 3 (i.e., rats with severe

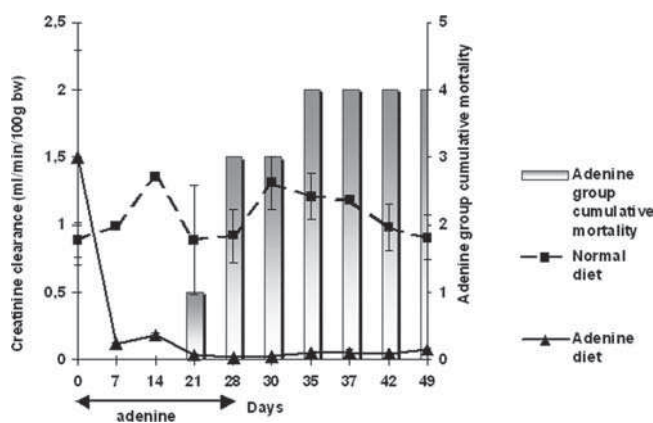


FIG. 2. Time course of creatinine clearance (ml/min/100 g bw) and mortality in renally impaired (fed with adenine-containing diet for 4 weeks) and control rats. Values are mean \pm SD.

renal failure) (Table 2). In study 1 (low renal impairment), one rat receiving a dose of 2.5 mmol/kg was found dead on the second day of gadodiamide injection (corresponding to day 8) and in study 2, one rat had to be euthanized on day 16 for ethical reasons (loss of bodyweight, prostration, and loss of locomotor's activity). Five of the six rats from study 2 (intermediate renal impairment) presented epidermal skin lesions (from day 14) and severe ulcerative and squamous skin eruptions were observed in two gadodiamide-treated rats in study 3 (i.e., severe renal failure) from day 22. No macroscopic skin lesions were observed in rats in study 1, corresponding to low-grade renal failure.

Histopathology. No histological abnormalities were observed on skin samples from treated rats in study 1 (Table 2). The skin was considered to be abnormal in four of the six gadodiamide-treated rats in study 2: gradual dermal fibrosis associated with hypercellularity and/or inflammation. Marked foci of early calcification with or without low-grade fibrosis and few inflammatory cells were observed in 5 of the 11 gadodiamide-treated rats in study 3. ED-1 and TGF β_1 -positive cells were also observed in rats included in study 2 and in the surviving rat included in study 3 (Fig. 4). Blinded analysis of the kidneys (and livers) at sacrifice did not reveal any treatment-related abnormality in gadodiamide-treated rats. Kidney histopathological data were therefore pooled according to the study ("low," "medium," and "high" renal failure) (Table 1).

Major tubular lesions including marked lithiasis, inflammation, and interstitial fibrosis were observed in the kidneys of rats from studies 2 and 3, whereas lithiasis was rarely observed in study 1 animals (foci of tubular lesions associated with inflammation and fibrosis were sometimes observed) (Table 1).

Total gadolinium measurement and relaxometry studies. In all studies, a gradual increase in *in vivo* r_1 relaxivity value, exceeding the *in vitro* r_1 range, was observed in skin samples of gadodiamide-treated rats (Fig. 5).

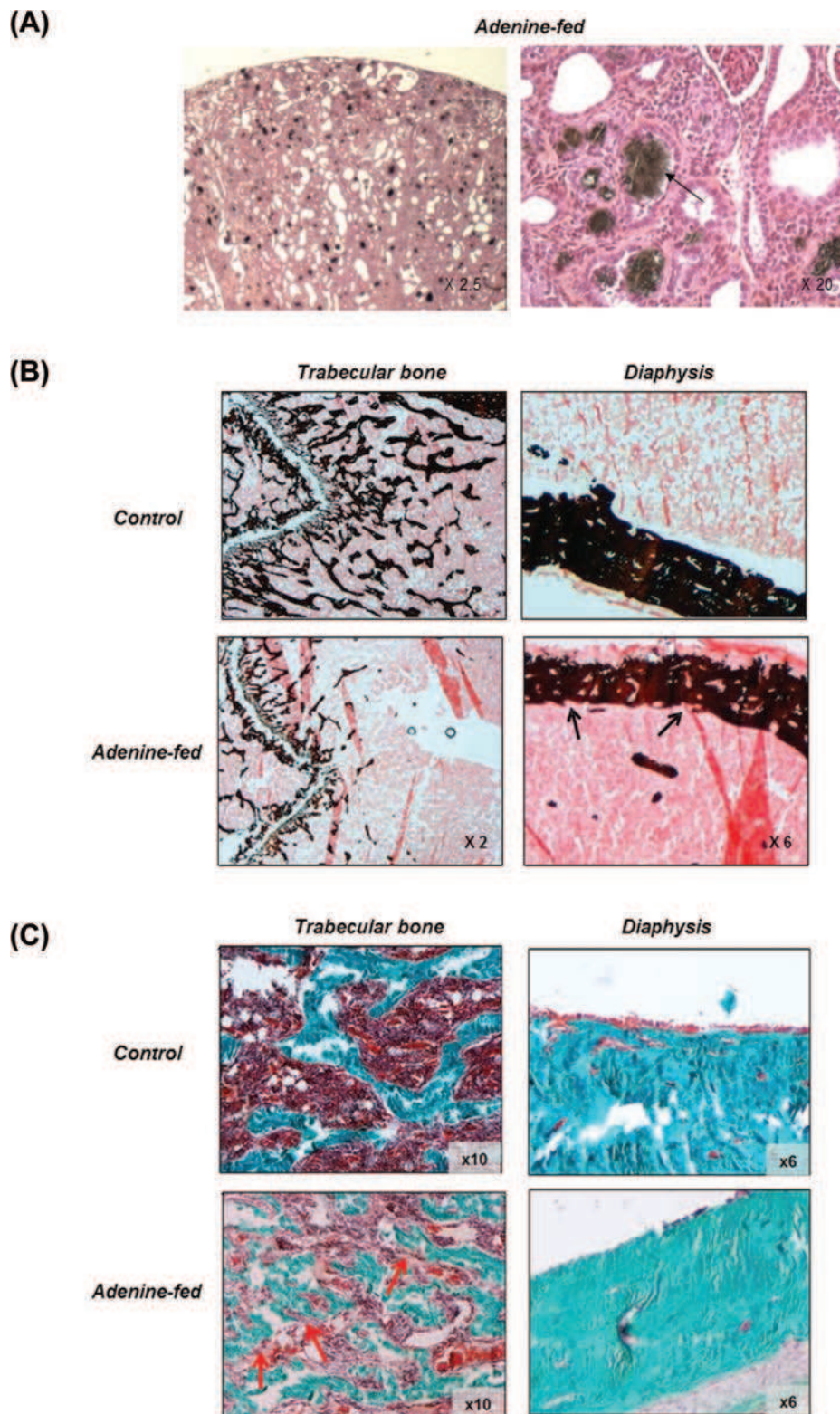


FIG. 3. Histological findings in kidneys (A) and femurs (B and C) of normal or renally impaired rats. HES stain of kidneys (A), Von Kossa stain (black)/Ponceau-Fuchsin (pink) (B), and Masson's Trichrome stain (C) of femurs were performed 49 days after starting adenine diet. In kidneys (A), interstitial fibrosis associated with a few inflammatory cells was observed in rats fed with adenine diet. Major tubular lesions, with intratubular lithiasis-like precipitate (black arrow) associated with granuloma, normal glomeruli, and vessels were also observed in this group. In femurs (B), cell infiltrate in the diaphysis (black arrow) degrading bone surface, and decreased trabeculae were observed in adenine-fed rats. The bone marrow (brown/red) appears less dense compared with physiological bone and fibrous areas (red arrow) were observed in the trabecular bone and/or diaphyseal bone (C).

TABLE 1
Plasma Creatinine and BUN Levels Measured on the First Day of 2.5 mmol/kg of Gadodiamide Treatment and/or at Sacrifice, and Histopathology of Kidneys at Sacrifice (HES Stain) in Rats With Low-Grade, Intermediate, or Severe Renal Failure (8, 14, or 16 Days of Adenine-Enriched Diet)

Study	Degree of renal failure	Plasma [creatinine] ($\mu\text{mol/l}$)		Plasma [BUN] (mmol/l)		Histopathology of kidney (number of rats)			
		First day of gadodiamide	Sacrifice	First day of gadodiamide	Grade	Lithiasis	Tubular lesions	Inflammation	Interstitial fibrosis
1	Low-grade				Absence	12/15	7/15	7/15	7/15
		Day 7: 48.2 \pm 3.2	Day 32: 21.5 \pm 0.7	Day 7: 14.5 \pm 3.6	Mild	1/15	4/15	4/15	4/15
					Moderate	1/15	1/15	1/15	1/15
2	Intermediate				Severe	1/15	3/15	3/15	3/15
		Day 7: 59.3 \pm 7.2	Day 32: 66.6 \pm 10.2	Day 7: 14.9 \pm 6.6	Absence	0/10	0/10	0/10	0/10
					Mild	0/10	0/10	0/10	0/10
3	Severe				Moderate	1/10	1/10	1/10	1/10
		Day 14: 139.9 \pm 11.7	Day 39: 56.9 \pm 12.1	Day 14: 25.6 \pm 4.2	Severe	9/10	9/10	9/10	9/10
					Absence	2/5	0/5	0/5	0/5
Statistical analysis	Study 3 vs. studies 1 and 2, $p < 0.001$	Study 1 vs. studies 2 and 3, $p < 0.05$	Study 3 vs. studies 1 and 2, $p < 0.001$			Study 1 vs. study 2, $p < 0.001$	Study 1 vs. study 2, $p < 0.01$	Study 1 vs. study 2, $p < 0.01$	Study 1 vs. study 2, $p < 0.01$
						Study 1 vs. study 3, $p < 0.05$	Study 1 vs. study 3, $p < 0.05$	Study 1 vs. study 3, $p < 0.05$	Study 1 vs. study 3, $p < 0.05$

Note. "Mild lesions" corresponding to lesions < 25% of slide surface; "moderate" lesions corresponding to lesions between 25 and 50% of slide surface; "severe" lesions corresponding to lesions > 50% of slide surface.

TABLE 2
Clinical Signs and Skin Histopathology After Treatment With Gadodiamide in Rats With Low-Grade, Intermediate, or Severe Renal Failure (8, 14, or 16 Days of Adenine-Enriched Diet)

Study	Gadodiamide dose	N (rats)	Mortality	Morbidity/Macroscopic skin lesions	Skin histopathology
1 (low-grade renal failure)	5 \times 1.0 mmol/kg	6	No	No	No abnormalities
	5 \times 2.5 mmol/kg	6	1 found dead (day 8)	No	No abnormalities
	Saline	4	0/4	No	No abnormalities
2 (intermediate renal failure)	5 \times 2.5 mmol/kg	6	1 euthanized (Day 16)	4/5: skin lesions (2: ++) Euthanized rat: minor abdominal lesions	Two rats: no lesions Four rats (including euthanized rat): hypercellularity TGF β + and inflammatory foci (ED-1-positive macrophages)
	Saline	4	0	No	No abnormalities
3 (severe renal failure)	5 \times 2.5 mmol/kg	11	10	Prostration, piloerection, loss of body weight, and skin lesions (two rats)	Five rats: Low-grade fibrosis at the time of euthanasia, few inflammatory foci, and TGF β + immunostaining. Early calcification foci
	Saline	5	0	No	No abnormalities

Total gadolinium concentration in skin at sacrifice (25 days after the first injection of gadodiamide) was higher in the single surviving rat from study 3 (216.6 nmol/g) than in rats included in study 2 (168.4 \pm 105.2 nmol/g) and rats with low-grade renal failure (69.0 \pm 43.1 nmol/g). Interestingly, in Study 2, the skin total Gd concentration measured in the only rat without skin lesions was around 7-fold lower than in the rats with skin lesions (31.3 vs. 202.7 \pm 83.1 nmol/g). A significant positive

linear correlation was observed between skin total Gd and plasma creatinine concentrations (Fig. 6).

Comparison of All Categories of GCs in Rats Receiving a 16-Day Adenine Diet

Clinical findings. Three of four gadodiamide-treated rats were either found dead or had to be euthanized for ethical reasons (loss of bodyweight > 20%, prostration, and marked loss of

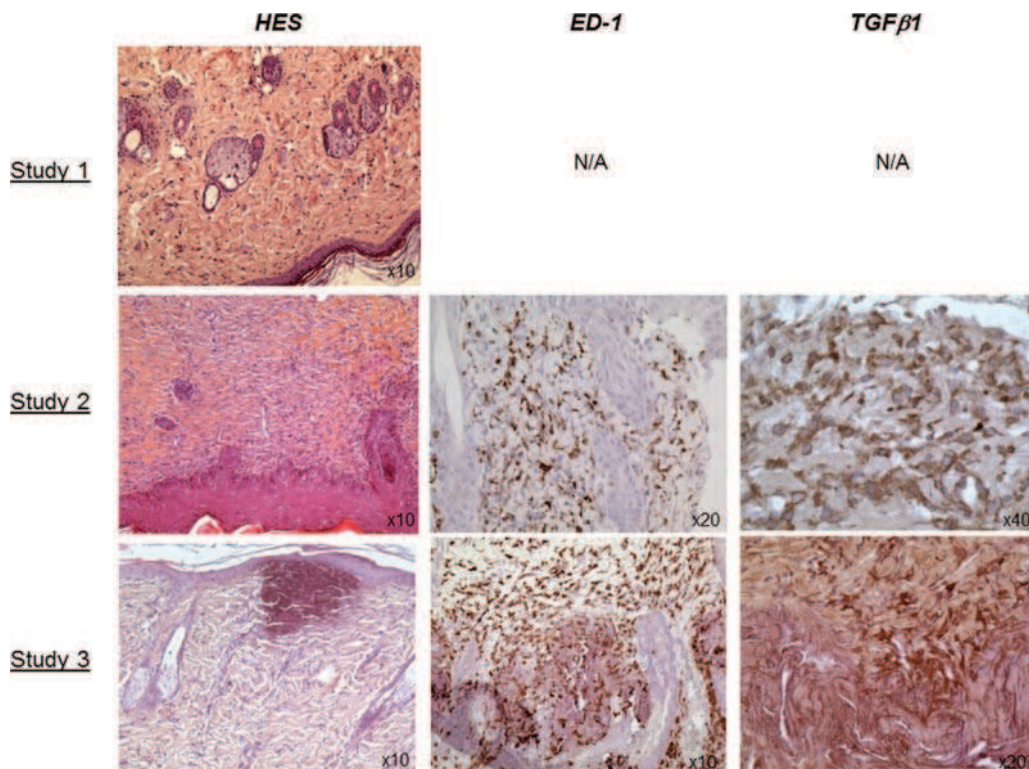


FIG. 4. Histological skin lesions in the dermis: HES staining to analyze cellular lesions, TGF β_1 staining, and ED-1 staining to detect macrophages were performed at the end of the studies (day 32 for studies 1 and 2; day 39 for study 3).

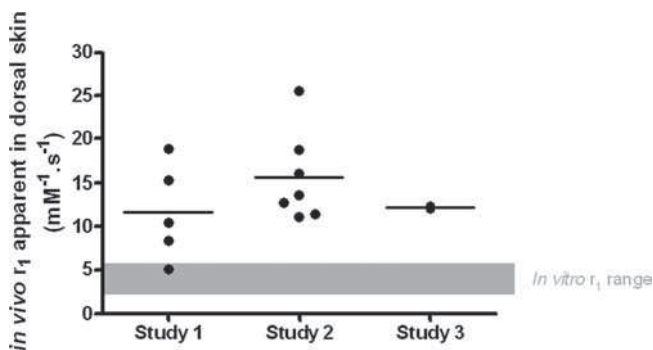


FIG. 5. *In vivo* relaxivity r_1 values (60 MHz, 37°C) in skin samples from rats fed an adenine diet for 8 (study 1), 14 (study 2), or 16 (study 3) days and treated with five consecutive daily injections of gadodiamide (2.5 mmol/kg). Gray bars correspond to *in vitro* r_1 range of gadodiamide in dorsal skin.

locomotor activity). Transient epidermal lesions were observed between day 17 and 18 on the abdomen of four of the six gadopentetate-treated rats. No macroscopic skin lesions were observed for other treatments except for wrinkled skin in the gadodiamide-treated survivor. No significant difference in body weight changes was observed between the test groups. One rat in the gadoterate and gadobenate-treated groups died, but death was unrelated to injection of the product (due to anesthesia).

Biochemistry and hematology. No significant differences were observed between groups in terms of plasma creatinine,

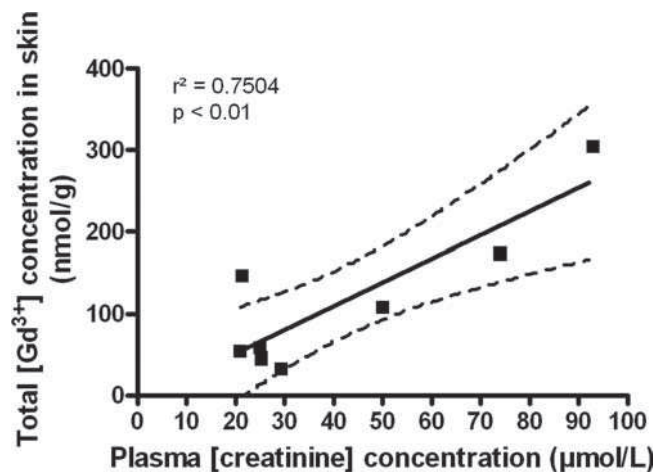


FIG. 6. Positive linear correlation between plasma creatinine and skin gadolinium concentration at sacrifice in rats receiving five consecutive daily injections of gadodiamide (2.5 mmol/kg) following adenine diet for either 8 days (study 1) or 14 days (study 2). Dotted lines indicate 95% confidence limits.

sodium, potassium, chloride, phosphorus, calcium, and iron levels or hematological parameters (data not shown).

On day 16, plasma MCP-1 levels were significantly higher (13.2 ± 1.8 pg/ml vs. 4.4 ± 1.4 pg/ml in the control group; $p < 0.001$ vs. other groups) for gadodiamide-treated rats. However, no differences between treatments were observed on day 39. No significant changes in the plasma levels of the other

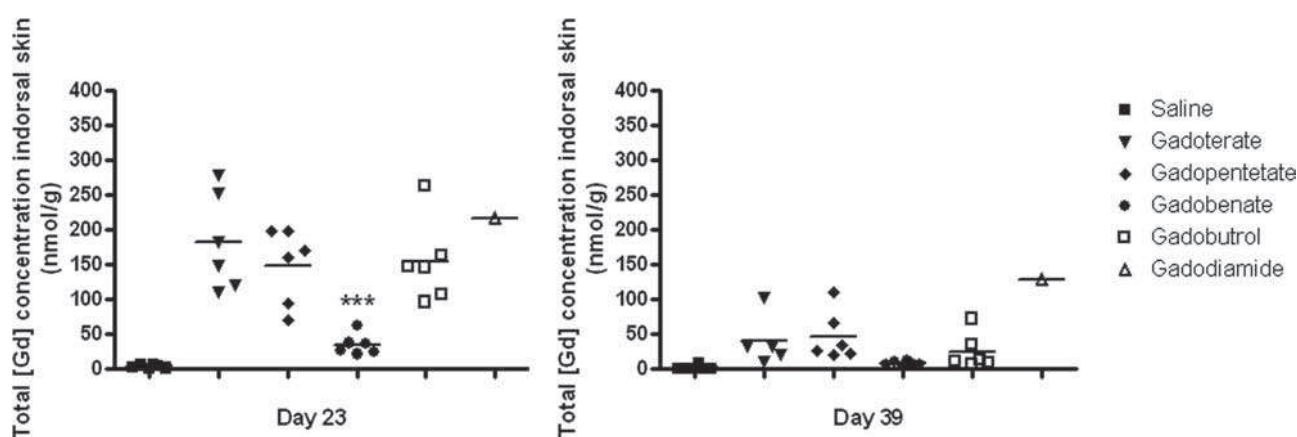


FIG. 7. Total Gd concentration measured in skin samples of rats fed an adenine diet for 16 days and receiving each GC (5×2.5 mmol/kg iv from day 14 to 18) on days 23 and 39 (i.e., sacrifice) after starting adenine diet (ICP-MS measurement, nmol/g). Mean and individual values are given. *** $p < 0.001$ vs. all groups.

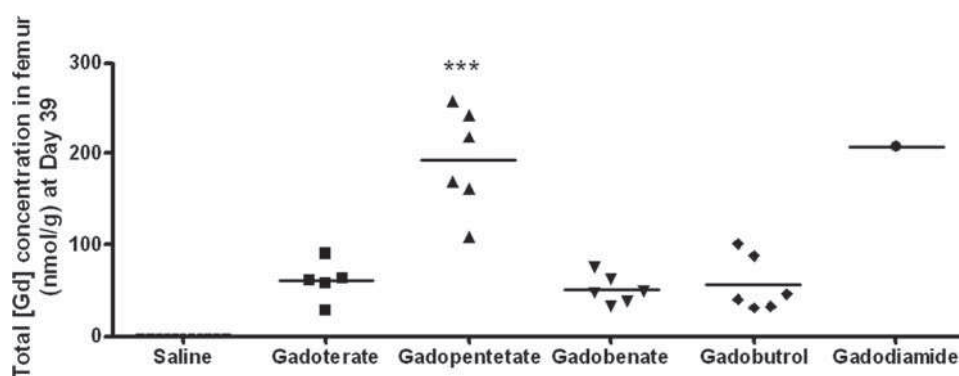


FIG. 8. Total Gd concentration measured in femur samples (epiphyses) of rats fed an adenine diet for 16 days and receiving each GC (5×2.5 mmol/kg iv from day 14 to 18) on day 39 (i.e., sacrifice) after starting adenine diet (ICP-MS measurement, nmol/g). Mean and individual values are given. *** $p < 0.001$ vs. all groups.

cytokines and the enzyme TIMP-1 were observed, regardless of the GC tested (data not shown).

Histopathology. Skin biopsies were studied on days 14, 23, and 39. No abnormalities were observed on skin biopsies from treated groups except for the gadodiamide-treated survivor rat, in which mild inflammation of the dermis without fibrosis was observed at day 39. Positive immunostaining for TGF β_1 , TIMP-1, and ED-1 was observed in the dermis of the gadodiamide-treated survivor at sacrifice. No increase in the density of CD34- and prolyl-4-hydroxylase-positive cells was observed in the dermis, whatever the groups. At sacrifice, no abnormalities were observed in the lungs, kidney, or liver samples in any of the treatment groups.

Gadolinium Measurement

Plasma-dissociated Gd³⁺ levels. The plasma Gd³⁺ concentration at day 21 was below the limit of detection for the ionic macrocyclic GC gadoterate and the nonionic macrocyclic GC gadobutrol. At this time point, it was 79.3 μ M in the single gadodiamide-treated survivor. In one rat from the gadobenate and gadopentetate-treated groups with measurable Gd³⁺ levels, the dissociated Gd³⁺ concentrations were 0.44 and 3.0 μ M, respectively.

Skin total gadolinium levels. No significant differences in skin total Gd concentration on day 23 were observed between treatment groups, except for gadobenate-treated rats, in which the total Gd concentration was significantly lower than in the other groups ($p < 0.001$). A dramatic decrease in the skin total Gd concentration on day 39 (vs. day 23) was observed in the gadoterate, gadopentetate, gadobenate, and gadobutrol-treated groups. The total Gd concentration in dorsal skin on day 39 was higher in the gadodiamide-treated survivor (128.8 nmol/g) than in the other GC-treated groups (Fig. 7).

Total gadolinium levels in the femur. Total Gd concentrations in the femur on day 39 were higher in the gadopentetate-treated groups than in the gadoterate, gadobenate, and gadobutrol groups ($p < 0.001$) (Fig. 8). A high total Gd concentration was measured in the gadodiamide-treated survivor (207.8 nmol/g).

Total gadolinium levels in kidneys and liver. No significant differences in total Gd concentrations in the kidneys and liver were observed between treatment groups (data not shown).

TABLE 3
***In Vitro* r_1 Relaxivity Value (Spiking Studies With Gadoterate, Gadodiamide, Gadopentetate, Gadobutrol, or Gadobenate [60 MHz, 37°C]) in D₂O/H₂O and Various Tissue Matrices From Control Rats**

Matrix	<i>In vitro</i> r_1 relaxivity (mM ⁻¹ ·s ⁻¹) [± 23%]				
	Gadoterate	Gadopentetate	Gadobenate	Gadobutrol	Gadodiamide
D ₂ O/H ₂ O (90/10 vol/vol)	3.3 [2.5–4.1]	3.8 [2.9–4.7]	4.8 [3.7–5.9]	3.8 [2.9–4.7]	3.7 [2.9–4.6]
Femoral epiphysis	3.8 [2.9–4.7]	4.3 [3.3–5.3]	4.6 [3.5–5.7]	4.5 [3.5–5.6]	4.6 [3.5–5.7]
Dorsal skin	3.0 [2.3–3.7]	3.6 [2.8–4.4]	4.8 [3.7–5.9]	3.5 [2.7–4.3]	4.5 [3.5–5.6]
Liver	4.1 [3.2–5.0]	4.4 [3.4–5.5]	5.7 [4.4–7.0]	4.3 [3.3–5.4]	4.0 [3.1–4.9]

Note. The uncertainty of relaxivity r_1 measurements was set at $r_1 \pm 23\%$.

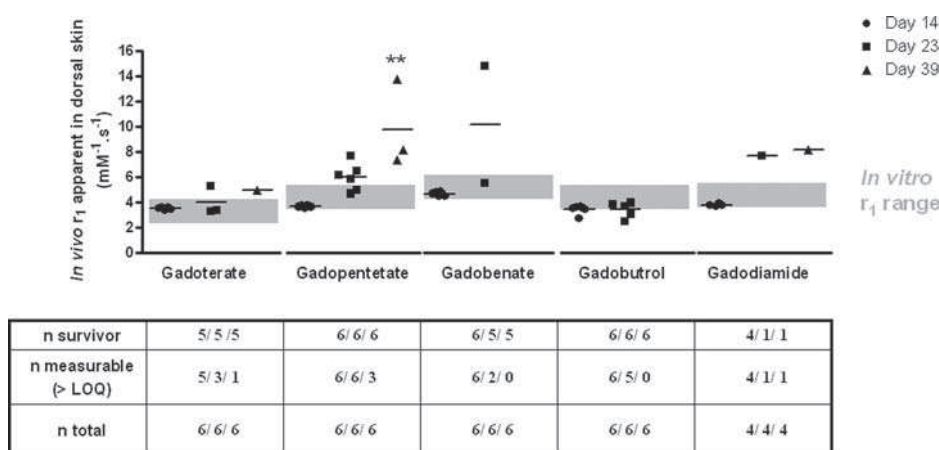


FIG. 9. *In vivo* relaxivity r_1 values (60 MHz, 37°C) in skin samples of rats fed an adenine diet for 16 days and treated with each GC (5 × 2.5 mmol/kg) on day 23 or 39 (i.e., sacrifice) after starting adenine diet. Mean and individual values are given. Gray bars correspond to *in vitro* r_1 range of each GC in dorsal skin ($r_1 \pm 23\%$). ** $p < 0.01$ between day 14 and day 39 in gadopentetate-treated group. LOQ, limit of quantification.

Relaxometry Studies

The *in vitro* r_1 relaxivity values obtained in D₂O/H₂O, skin, liver, and femoral epiphysis matrices are shown in Table 3.

Relaxometry values in the skin. In *in vivo* studies, the skin r_1 relaxivity value increased from $4.0 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ on day 14 to $10.6 \pm 3.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ on day 39 in the gadopentetate group ($p < 0.01$), and from $5.1 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ on day 14 to $11.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (two rats had measurable r_1 values) on day 23 in the gadodiamide group ($p < 0.1$). The skin r_1 values on days 23 and 39 were higher in the gadodiamide group than the skin r_1 values on day 14, whereas no significant changes were observed in the other groups (Fig. 9).

The r_1 relaxivity values measured in skin samples of the gadopentetate group were higher than those of the *in vitro* range on days 23 and 39. The r_1 relaxivity values measured in skin samples of the gadoterate and gadobutrol groups were situated within the *in vitro* range, but no conclusions could be reached for the r_1 values measured in the gadobenate

and gadodiamide groups due to the insufficient number of animals.

Relaxometry values in the femur. The *in vivo* r_1 relaxivity values in the femoral epiphysis were higher in the gadobenate group ($15.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, two rats with measurable levels) and gadopentetate group ($8.8 \pm 1.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), than in the gadoterate group (no rats with calculable r_1 value, as the $1/T1 - 1/T1_{\text{diamagnetic}}$ value less than 20% of $1/T1_{\text{diamagnetic}}$ due to a low total Gd concentration). One rat in the gadobutrol-treated group had a measurable r_1 value ($6.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). The r_1 relaxivity values measured in femoral epiphysis samples of the gadopentetate group were higher than those of the *in vitro* range (Fig. 10A).

Relaxometry values in the liver. No significant differences were observed between groups in terms of *in vivo* r_1 value in the liver. The *in vivo* r_1 relaxivity values measured in liver samples from the gadopentetate and gadobenate groups were higher than the respective *in vitro* ranges (Fig. 10B).

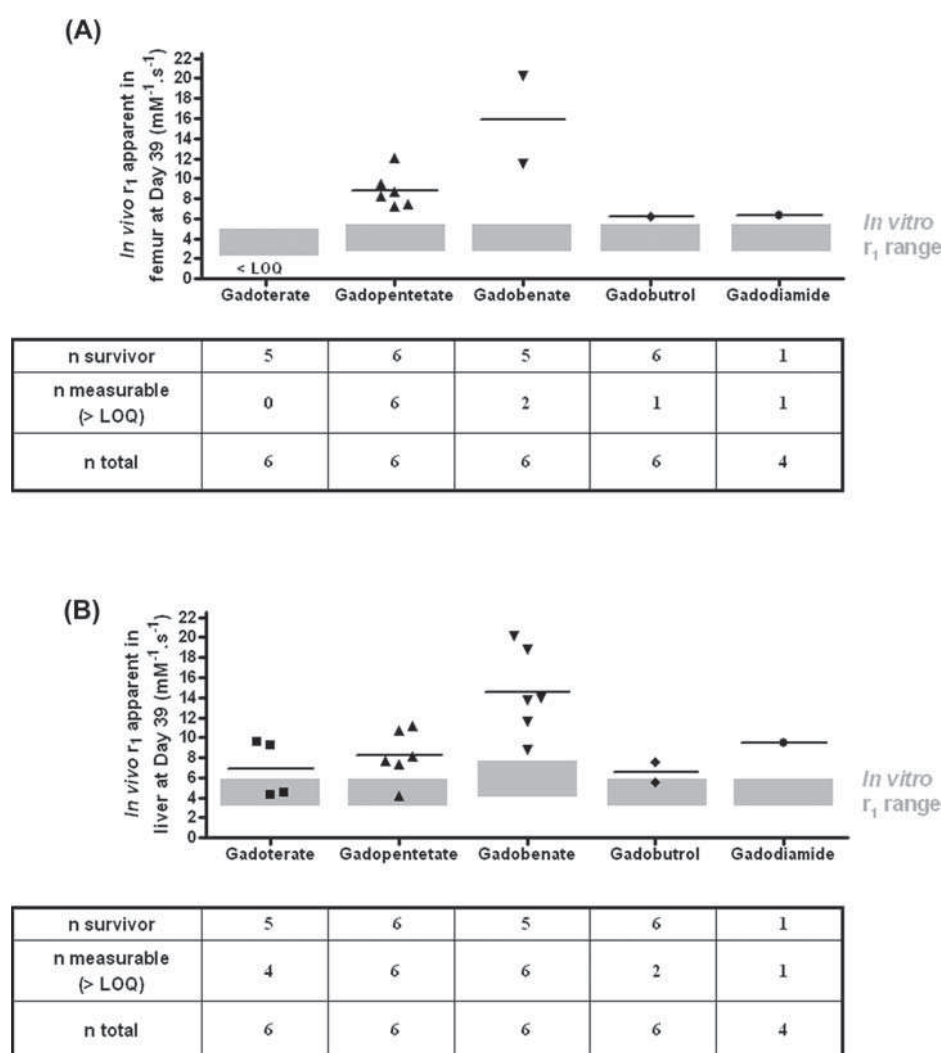


FIG. 10. *In vivo* relaxivity r_1 values (60 MHz, 37°C) in femoral epiphysis (A) or liver (B) samples of rats fed an adenine diet for 16 days and treated with each GC (5×2.5 mmol/kg) on day 39 (i.e., sacrifice) after starting adenine diet. Values are mean and individual values. Gray bars correspond to *in vitro* r_1 range of each GC in femur (A) or liver (B) ($r_1 \pm 23\%$). LOQ indicates limit of quantification.

DISCUSSION

Clinically relevant preclinical models are crucial to elucidate the mechanism of this devastating disease. The five-sixth SNx rat model is frequently used to mimic human renal failure (Fretellier *et al.*, 2011a; Grant *et al.*, 2009; Haylor *et al.*, 2010; Pietsch *et al.*, 2009). This study used the adenine-enriched model of renal failure in rats, developed by Yokozawa *et al.* (1986). Basically, adenine is converted to AMP. However, in the presence of excess of adenine, an alternative pathway is activated, leading to 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis and eventually to renal failure (Koeda *et al.*, 1988; Okada *et al.*, 1999). Modulation of the duration of adenine diet resulted in various degrees of renal failure, allowing maintenance of renal function for a defined period, in agreement with Okada *et al.* (1999). Hyperphosphatemia associated with osteodystrophy (*osteitis*

fibrosa) was observed under our study conditions. Osteitis fibrosa is common in patients with chronic renal failure (Coladonato, 2005). The most severe renal impairment was observed when the adenine-containing diet was given for 4 weeks. However, progressively increasing mortality was also observed, making a 4-week protocol unsuitable for further studies.

We subsequently investigated the relationship between the amplitude of renal failure and the clinical effects of gadodiamide. Most reported cases of NSF are associated with this agent (Rodby, 2011). High mortality and macroscopic skin lesions were observed in two rats with severe renal impairment. Microscopic lesions (i.e., fibrosis and calcification) were observed in 5 of the 11 rats from this group. In rats with intermediate renal failure, the majority of rats developed ulcerative and squamous skin eruptions associated with fibrosis, hypercellularity, and inflammation. Overexpression of the profibrotic

marker TGF β_1 , the collagenase inhibitor TIMP-1, and an increased number of ED-1-positive macrophages in the skin were observed. These findings are in agreement with a previously published report (Fretellier *et al.*, 2012) and with those observed in NSF patients (Jiménez *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2008, 2010). No toxicity was observed in rats with low-grade renal impairment. Under these conditions, skin profibrotic lesions and systemic toxicity (including mortality) induced by gadodiamide were therefore inversely correlated with baseline renal function. These findings are clinically relevant because the majority of cases have occurred in patients with ESRD, and about 20% were reported in patients with acute kidney injury or stage 4 chronic kidney disease (CKD) (Abu-Alfa, 2011). There have been no definitive NSF cases reported in patients with stage 3 CKD to date, with the exception of one possible case (Abu-Alfa, 2011). Pietsch *et al.* (2009) reported that renal failure in rats induced prolonged GC circulation time, as observed in patients with severe renal impairment, which is consistent with the positive correlation between plasma creatinine levels and skin total Gd concentrations found in this study and elsewhere (Haylor *et al.*, 2010). Pietsch *et al.* also reported skin lesions in rats receiving gadodiamide. Interestingly, lesions occurred in the animals with the highest skin Gd concentration. We observed similar findings: the only rat without skin lesions and intermediate renal failure had a lower skin Gd concentration than rats with macroscopic skin lesions. Our findings support the hypothesis that skin lesions may be dependent on the amount of Gd retained in the tissues. Interestingly, High *et al.* (2010) showed gradients of Gd deposition correlated to fibrosis and hypercellularity in the skin of two NSF patients.

The purpose of our third study was to compare all categories of GCs in rats with impaired renal function. High mortality was observed after administration of gadodiamide, consistent with the results of our first study. However, no skin lesions were observed in this group, in contrast with the literature (Grant *et al.*, 2009; Fretellier *et al.*, 2011a, 2012; Pietsch *et al.*, 2009). This discrepancy can be explained by early death of the animals. Transient punctate skin lesions were found in four out of six gadopentetate-treated rats during the injection week. To our knowledge, this has never been previously reported. It is noteworthy that gadopentetate, a linear, ionic GC, like gadodiamide, belongs to the high-risk category of GCs according to both the European Medicines Agency and the FDA (Rodby, 2011; Thomsen, 2011). However, no histopathological lesions were observed in this group. The first skin biopsy was performed 5 days after the last GC injection, which might explain the absence of histological lesions; epidermal lesions were transient and occurred earlier.

Skin Gd levels gradually declined in all groups except in the gadodiamide group, in which the survivor had a high skin total Gd concentration. High Gd levels have already been reported for this compound in the skin (Pietsch *et al.*, 2009; Sieber *et al.*, 2008) and in the femur (Sieber *et al.*, 2008). Interestingly, a high total Gd concentration was also observed in the femur

of gadopentetate-treated rats. In rats, 50% of gadobenate is excreted by the liver (Lorusso *et al.*, 1999), unlike other GCs which are excreted exclusively by the kidneys (Idée *et al.*, 2009). This may explain the relatively low total Gd concentrations found in tissues in gadobenate-treated rats.

To our knowledge, this is the first study to compare the *in vivo* stability of all categories of GCs. Relaxometry can be used to determine longitudinal relaxation rates of tissues. Gadolinium, present in paramagnetic GCs, accelerates relaxation times (Caravan *et al.*, 1999). Relaxometry is therefore a useful tool to investigate the *in vivo* dissociated vs. chelated state of Gd following systemic administration of CG (Fretellier *et al.*, 2011b). Our results suggest gradual *in vivo* dissociation, with release of soluble Gd³⁺ from gadodiamide and from the linear, ionic GC gadopentetate, whereas the more stable macrocyclic GCs gadoterate and gadobutrol remained stable throughout the study. *In vivo* dissociation of gadodiamide has already been reported in the literature (Fretellier *et al.*, 2011b, 2012), but *in vivo* dissociation of gadopentetate has never been previously reported, to our knowledge. The ionic and linear GC, gadobenate, induced increased r_1 relaxivity values in the skin (day 23) and femur, which may suggest gradual *in vivo* dissociation of this compound, but which would also be consistent with protein binding (4%) which is known to increase the r_1 relaxivity value (Port *et al.*, 2005).

We therefore report *in vivo* dissociation of linear GCs, gadopentetate and gadodiamide, with gradual release of soluble, dissociated, Gd³⁺. Macrocyclic GCs have higher kinetic stability than linear GCs (Port *et al.*, 2008), as demonstrated directly (Frenzel *et al.*, 2008) or indirectly (Laurent *et al.*, 2001). Free Gd³⁺ has been reported to induce fibroblast proliferation (Li *et al.*, 2010), but our data do not allow us to draw conclusions on a causal link between dissociated Gd³⁺ and skin lesions and mortality.

In summary, cutaneous and systemic toxicity induced by gadodiamide depends on baseline renal function in an adenine rat model of NSF. *In vivo* dissociation of gadodiamide with gradual release of soluble Gd³⁺ was observed, whereas macrocyclic agents remained stable over the study period. For the first time, gradual dissociation was suspected for the ionic, linear GC gadopentetate. Further studies are required to investigate the molecular potential effect of nonchelated Gd³⁺.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs Anthony Saul and Dominique Debize-Henderson for reviewing the English version of the manuscript and to Charlotte Gary for helpful discussions. N.F., J.M.I., G.J., C.F., N.P., N.B., C.H., M.P. and C.C. are or were employees of Guerbet.

FUNDING

The work was supported by Guerbet.

REFERENCES

- Abu-Alfa, A. K. (2011). Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium-based contrast agents. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **18**, 188–198.
- Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J., and Lauffer, R. B. (1999). Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **99**, 2293–2352.
- Coladonato, J. A. (2005). Control of hyperphosphatemia among patients with ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**(Suppl. 2), S107–S114.
- Cowper, S. E., Rabach, M., and Girardi, M. (2008). Clinical and histological findings in nephrogenic systemic fibrosis. *Eur. J. Radiol.* **66**, 191–199.
- Crissman, J. W., Goodman, D. G., Hildebrandt, P. K., Maronpot, R. R., Prater, D. A., Riley, J. H., Seaman, W. J., and Thake, D. C. (2004). Best practices guideline: Toxicologic histopathology. *Toxicol. Pathol.* **32**, 126–131.
- Frenzel, T., Lengsfeld, P., Schirmer, H., Hütter, J., and Weinmann, H. J. (2008). Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37 degrees C. *Invest. Radiol.* **43**, 817–828.
- Fretellier, N., Idée, J. M., Guerret, S., Hollenbeck, C., Hartmann, D., González, W., Robic, C., Port, M., and Corot, C. (2011a). Clinical, biological, and skin histopathologic effects of ionic macrocyclic and nonionic linear gadolinium chelates in a rat model of nephrogenic systemic fibrosis. *Invest. Radiol.* **46**, 85–93.
- Fretellier, N., Idée, J. M., Dencausse, A., Karroum, O., Guerret, S., Poveda, N., Jestin, G., Factor, C., Raynal, I., Zamia, P., et al. (2011b). Comparative in vivo dissociation of gadolinium chelates in renally impaired rats: A relaxometry study. *Invest. Radiol.* **46**, 292–300.
- Fretellier, N., Idée, J., Bruneval, P., Guerret, S., Daubiné, F., Jestin, G., Factor, C., Poveda, N., Dencausse, A., Massicot, F., et al. (2012). Hyperphosphataemia sensitizes renally impaired rats to the profibrotic effects of gadodiamide. *Br. J. Pharmacol.* **165**(4b), 1151–1162.
- Galan, A., Cowper, S. E., and Bucala, R. (2006). Nephrogenic systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy). *Curr. Opin. Rheumatol.* **18**, 614–617.
- Girardi, M., Kay, J., Elston, D. M., Leboit, P. E., Abu-Alfa, A., and Cowper, S. E. (2011). Nephrogenic systemic fibrosis: Clinicopathological definition and workup recommendations. *J. Am. Acad. Dermatol.* **65**, 1095–1106.e7.
- Grant, D., Johnsen, H., Juelsrud, A., and Løvhaug, D. (2009). Effects of gadolinium contrast agents in naïve and nephrectomized rats: Relevance to nephrogenic systemic fibrosis. *Acta Radiol.* **50**, 156–169.
- Grobner, T. (2006). Gadolinium—a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol. Dial. Transplant.* **21**, 1104–1108.
- Haylor, J., Dencausse, A., Vickers, M., Nutter, F., Jestin, G., Slater, D., Idée, J. M., and Morcos, S. (2010). Nephrogenic gadolinium biodistribution and skin cellularity following a single injection of Omniscan in the rat. *Invest. Radiol.* **45**, 507–512.
- High, W. A., Ranville, J. F., Brown, M., Punshon, T., Lanzirrotti, A., and Jackson, B. P. (2010). Gadolinium deposition in nephrogenic systemic fibrosis: An examination of tissue using synchrotron x-ray fluorescence spectroscopy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **62**, 38–44.
- Idée, J. M., Port, M., Medina, C., Lancelot, E., Fayoux, E., Ballet, S., and Corot, C. (2008). Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: A critical review. *Toxicology* **248**, 77–88.
- Idée, J. M., Port, M., Dencausse, A., Lancelot, E., and Corot, C. (2009). Involvement of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: An update. *Radiol. Clin. North Am.* **47**, 855–69, vii.
- Jiménez, S. A., Artlett, C. M., Sandorf, N., Derk, C., Latinis, K., Sawaya, H., Haddad, R., and Shanahan, J. C. (2004). Dialysis-associated systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy): Study of inflammatory cells and transforming growth factor beta1 expression in affected skin. *Arthritis Rheum.* **50**, 2660–2666.
- Kelly, B., Pettitt, M., and Sanchez, R. (2008). Nephrogenic systemic fibrosis is associated with transforming growth factor beta and Smad without evidence of renin-angiotensin system involvement. *J. Am. Acad. Dermatol.* **58**, 1025–1030.
- Kelly, B. C., Markle, L. S., Vickers, J. L., Pettitt, M. S., Raimer, S. S., and McNeese, C. (2010). The imbalanced expression of matrix metalloproteinases in nephrogenic systemic fibrosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **63**, 483–489.
- Koeda, T., Wakaki, K., Koizumi, F., Yokozawa, T., and Oura, H. (1988). Early changes of proximal tubules in the kidney of adenine-ingesting rats, with special reference to biochemical and electron microscopic studies. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* **30**, 239–246.
- Laurent, S., Elst, L. V., Copoix, F., and Muller, R. N. (2001). Stability of MRI paramagnetic contrast media: A proton relaxometric protocol for transmetalation assessment. *Invest. Radiol.* **36**, 115–122.
- Li, J. X., Liu, J. C., Wang, K., and Yang, X. G. (2010). Gadolinium-containing bioparticles as an active entity to promote cell cycle progression in mouse embryo fibroblast NIH3T3 cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 547–557.
- Lorusso, V., Arbughi, T., Tirone, P., and de Haën, C. (1999). Pharmacokinetics and tissue distribution in animals of gadobenate ion, the magnetic resonance imaging contrast enhancing component of gadobenate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance). *J. Comput. Assist. Tomogr.* **23**(Suppl. 1), S181–S194.
- Morcos, S. K. (2008). Extracellular gadolinium contrast agents: Differences in stability. *Eur. J. Radiol.* **66**, 175–179.
- Newton, B. B., and Jiménez, S. A. (2009). Mechanism of NSF: New evidence challenging the prevailing theory. *J. Magn. Reson. Imaging* **30**, 1277–1283.
- Okada, H., Kaneko, Y., Yawata, T., Uyama, H., Ozono, S., Motomiya, Y., and Hirao, Y. (1999). Reversibility of adenine-induced renal failure in rats. *Clin. Exp. Nephrol.* **3**, 82–88.
- Pietsch, H., Lengsfeld, P., Steger-Hartmann, T., Löwe, A., Frenzel, T., Hütter, J., and Sieber, M. A. (2009). Impact of renal impairment on long-term retention of gadolinium in the rodent skin following the administration of gadolinium-based contrast agents. *Invest. Radiol.* **44**, 226–233.
- Port, M., Corot, C., Violas, X., Robert, P., Raynal, I., and Gagneur, G. (2005). How to compare the efficiency of albumin-bound and nonalbumin-bound contrast agents in vivo: The concept of dynamic relaxivity. *Invest. Radiol.* **40**, 565–573.
- Port, M., Idée, J. M., Medina, C., Robic, C., Sabatou, M., and Corot, C. (2008). Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: A critical review. *Biometals* **21**, 469–490.
- Rodby, R. A. (2011). Can gadolinium be given safely to a patient on dialysis? *Semin. Dial.* **24**, 370–371.
- Sieber, M. A., Lengsfeld, P., Frenzel, T., Golfier, S., Schmitt-Willich, H., Siegmund, F., Walter, J., Weinmann, H. J., and Pietsch, H. (2008). Preclinical investigation to compare different gadolinium-based contrast agents regarding their propensity to release gadolinium in vivo and to trigger nephrogenic systemic fibrosis-like lesions. *Eur. Radiol.* **18**, 2164–2173.
- Sieber, M. A., Steger-Hartmann, T., Lengsfeld, P., and Pietsch, H. (2009). Gadolinium-based contrast agents and NSF: Evidence from animal experience. *J. Magn. Reson. Imaging* **30**, 1268–1276.
- Thomsen, H. S. (2011). Contrast media safety—an update. *Eur. J. Radiol.* **80**, 77–82.
- Yokozawa, T., Zheng, P. D., Oura, H., and Koizumi, F. (1986). Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* **44**, 230–234.

6.3.1.2 Résultats et discussion

L'objectif de notre étude était la **mise au point d'un nouveau modèle sensibilisé et cliniquement pertinent de FSN** chez le Rat insuffisant rénal afin, par la suite, de discriminer toutes les catégories de CGs commercialisés.

L'administration d'une **alimentation enrichie en adénine** au long cours (4 semaines) a permis une **chute rapide** (dès la 1^{ère} semaine) de la fonction rénale. Dans nos conditions, la clairance de la créatinine a diminué plus rapidement que dans l'étude *princeps* d'Okada et coll. (1999). Une hyperphosphatémie a également été notée, ce qui est cohérent avec cette étude *princeps*. Une lithiase intratubulaire a été notée à l'examen histologique. Ce résultat est, lui aussi, cohérent avec la littérature (Koeda et coll. 1988). Cette **lithiase** est due à la précipitation de 2,8-dihydroxy-adénine (DHOA) dans la lumière des tubules rénaux (Koeda et coll., 1988). Dans nos conditions, ce phénomène était associé à un granulome péri-tubulaire, réaction inflammatoire probablement provoquée par le précipité intra-tubulaire. Notre modèle a également présenté une fibrose interstitielle, peu inflammatoire, du parenchyme rénal. L'examen histopathologique des fémurs des rats ayant reçu l'adénine a montré la présence de lésions osseuses mimant une **ostéite fibreuse**, forme la plus courante **d'ostéodystrophie** (Coladonato, 2005). Ce modèle nous est donc apparu très intéressant puisqu'il se traduit par une **insuffisance rénale très sévère** et **proche de la pathologie humaine**. Cependant, une mortalité progressive et importante est apparue à partir de la 3^e semaine, ne permettant pas d'utiliser ce protocole (4 semaines de nourriture enrichie en adénine) pour nos études suivantes.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le lien entre le degré de l'insuffisance rénale et les effets cliniques et histologiques du gadodiamide. Une **forte morbi-mortalité** a été observée chez les rats présentant une insuffisance rénale sévère (16 jours d'alimentation enrichie en adénine). Il faut souligner que des **lésions cutanées** (macroscopiques et histologiques) sont apparues chez certains animaux, ce qui est cohérent avec les observations de notre précédent modèle de néphrectomie des 5/6^e associé à une hyperphosphatémie (Fretellier et coll., 2012). Dans le modèle d'« insuffisance rénale modérée » (14 jours de régime alimentaire enrichi à l'adénine), la majorité des rats ont développé des lésions cutanées épidermiques (ulcérations et éruptions squameuses) et du derme (fibrose, hypercellularité, inflammation). En revanche, **aucune toxicité** n'a été observée chez les animaux présentant une insuffisance rénale de faible intensité (8 jours d'adénine).

Nos résultats montrent donc que la toxicité systémique et les lésions de fibroses dues au gadodiamide sont d'autant plus importantes que la fonction rénale est faible. Ces données sont parfaitement cohérentes avec la clinique. En effet, la quasi-totalité des cas de FSN sont décrits chez des patients présentant une IRC sévère (stade 4) ou terminale (stade 5), nécessitant un traitement par dialyse (Abu-Alfa, 2011).

Nous avons, ensuite, comparé toutes les catégories de CGs sur le modèle d'insuffisance rénale le plus sévère. Nous avons confirmé la **toxicité importante du gadodiamide** et sa **dissociation *in vivo***. Des **lésions cutanées punctiformes et transitoires** (disparition spontanée en 2 ou 3 jours) sont apparues précocement chez des rats ayant reçu de l'**acide gadopentétique**, un CG linéaire et ionique. Une **augmentation de la constante de relaxivité r_1** a été observée dans la peau et le fémur des rats recevant ce produit, suggérant une dissociation *in vivo* avec libération de Gd^{3+} dissocié et soluble. Chez l'Homme, ce CG est associé à des cas de FSN « purs » (Abujudeh et coll., 2009). Néanmoins, une concentration plasmatique de Gd^{3+} dissocié n'a été observée que chez un seul rat et elle était nettement inférieure à celle observée dans le plasma de rats ayant reçu le gadodiamide.

La **constante de relaxivité r_1 est augmentée** dans la peau (1 rat), le fémur (2 rats) et le foie (tous) des rats traités avec de l'**acide gadobénique**, un autre CG linéaire et ionique. Ces résultats peuvent suggérer une dissociation *in vivo* de ce produit, mais ils peuvent aussi s'expliquer par la liaison du complexe intact aux protéines, qui est une caractéristique de cet agent (Cavagna et coll., 1997).

Cette étude montre que la **toxicité systémique** et les **lésions de fibrose** dues à l'administration de gadodiamide **dépendent de la sévérité** l'insuffisance rénale. Par ailleurs, cette étude confirme la **toxicité importante du gadodiamide**. Les **CGs linéaires** étudiés se **dissocient *in vivo*** contrairement aux CGs macrocycliques, qui ont une meilleure stabilité cinétique et qui n'ont induit aucune toxicité dans nos conditions expérimentales.

6.3.2 Modèle d'insuffisance rénale sévère et stable

6.3.2.1 Introduction

Le modèle d'insuffisance rénale par ajout d'adénine, décrit plus haut, permet de moduler la fonction rénale (variation de la durée du régime enrichi en adénine). Dans l'article 4 (Fretellier et coll., 2013), nous avons montré que les effets toxiques et profibrosants du gadodiamide sont d'autant plus élevés que la fonction rénale est faible. Il est nécessaire de disposer d'un modèle permettant à la fois l'induction par le gadodiamide de lésions de fibrose et, d'autre part, qui ne soit pas associé à une toxicité systémique. Le modèle d'insuffisance rénale modérée nous semblait répondre à ces deux critères.

Toutefois, nous avons observé, dans des études ultérieures (non présentées ici) sur le **modèle d'insuffisance rénale modérée**, une **variabilité inter-individuelle** importante, certaines **incohérences** entre les résultats cliniques et ceux d'histologie et, enfin, une **amélioration de la fonction rénale** au cours du temps susceptible d'interférer avec nos résultats.

Un des objectifs de cette nouvelle étude a donc été la mise au point d'un **modèle cliniquement pertinent** de FSN, associé à une **variabilité inter-individuelle plus faible** et une **réponse plus homogène** aux plans chronologique et de l'intensité des effets cliniques, et enfin, permettant une **cohérence** des données macro- et microscopiques. Par conséquent, les animaux ont reçu une alimentation enrichie en **adénine une semaine supplémentaire** après la fin des injections, soit au total pendant 3 semaines (J0 à J21 contre 2 semaines). Ce protocole devrait permettre d'obtenir une **insuffisance rénale sévère et durable** tout au long de l'étude et ainsi **d'homogénéiser** la réponse (degré d'intensité et délai d'apparition des lésions).

Ultérieurement, sur ce nouveau modèle, nous avons aussi souhaité :

- documenter les effets cliniques, biochimiques et hématologiques de **deux types de CGs**, chez le Rat insuffisant rénal ou non : l'acide gadotérique et le gadodiamide ;
- étudier **l'influence de la structure** du CG sur l'apparition et l'intensité des lésions cutanées ;
- comparer les paramètres hématologiques, biochimiques et analytiques chez des rats présentant des **lésions cutanées macroscopiques** à ceux des rats **n'en présentant pas** ;
- documenter les **effets de l'hyperosmolalité** sur la fonction rénale et les paramètres biochimiques (administration de NaCl ajusté à l'osmolalité de la solution pharmaceutique d'acide gadotérique, la plus forte des produits utilisés, soit 1350 mOsm/kg H₂O).

6.3.2.2 Matériel et méthodes

- **Animaux**

L'expérimentation a été réalisée chez 41 rats mâles Wistar (Centre d'élevage René Janvier, CERJ) de 6 semaines (poids 200-220g). Les animaux sont maintenus sous des conditions de laboratoire standard à une température de 22 ± 2°C et un rythme obscurité/lumière de 12/12 heures. La

nourriture et l'eau sont fournies *ad libitum* pendant toute la durée de l'étude. Au début de l'expérimentation les animaux sont hébergés deux par cage puis 1 par cage à partir de J7. L'étude a été réalisée conformément à la législation française sur l'expérimentation animale et à la Directive Européenne 2010/63/EU.

- **Produits testés:**

L'étude comprend 5 groupes.

Tableau 33 : Groupes et produits injectés

Groupe	Insuffisance rénale	Produits	Nom commercial	Fournisseur	Concentration	Dose	Volume injecté	n
1	Oui	NaCl (300 mOsm/Kg H ₂ O)	-	Lavoisier	9 g/L	-	5 mL/kg	10
2	Oui	NaCl hyperosmolaire (1350 mOsm/Kg H ₂ O)	-	-	39 g/L	-	5 mL/kg	4
3	Non	gadodiamide	Omniscan®	GE Healthcare	500 mM	2,5 mmol/kg	5 mL/kg	6
4	Oui	gadodiamide	Omniscan®	GE Healthcare	500 mM	2,5 mmol/kg	5 mL/kg	15
5	Oui	acide gadotérique	Dotarem®	Guerbet	500 mM	2,5 mmol/kg	5 mL/kg	6

NB : Nous avons souhaité augmenter le nombre d'animaux insuffisants rénaux et recevant soit du NaCl 0,9% (témoin), soit du gadodiamide (groupe 4) afin d'augmenter la puissance statistique. En effet, nous avons observé une variabilité inter-individuelle dans l'apparition des lésions cutanées.

- **Réalisation de l'expérimentation**

Le synoptique de l'étude apparaît dans la **Figure 71** ci-dessous :

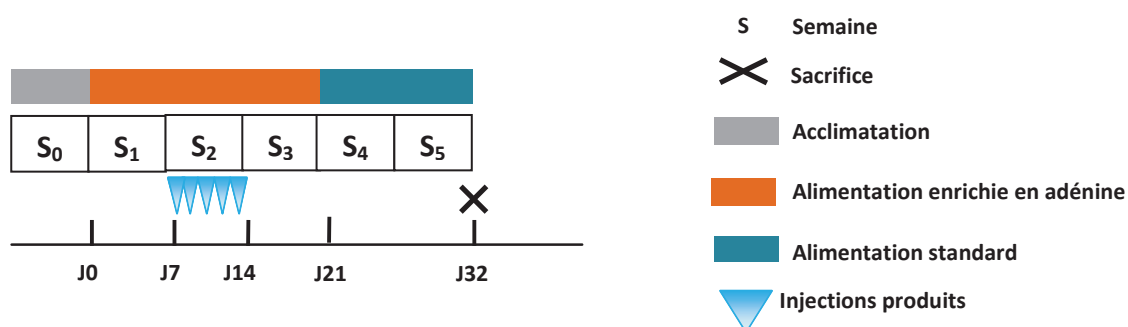


Figure 71 : Synoptique de l'étude

Le protocole de cette étude est détaillé dans la **Figure 72** présentée ci-dessous.

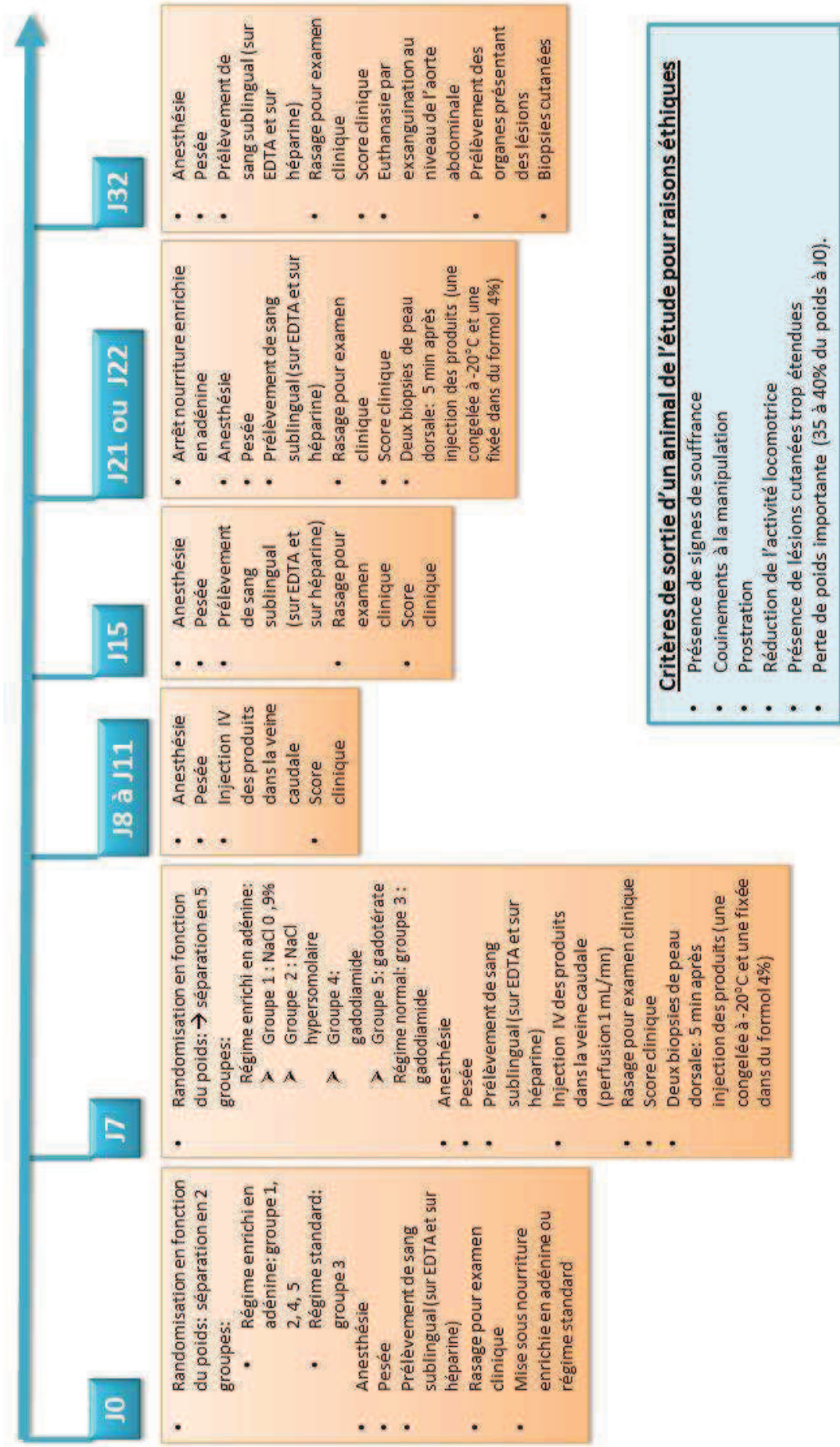


Figure 72 : Protocole de l'étude

Les prélèvements sublinguaux, les biopsies cutanées, les injections et les euthanasies ont été effectués sur animal anesthésié à l'isoflurane (induction 3,5% puis maintien à 2,5%) supplémentée à 1 L/mn d'oxygène. Les rats ont été euthanasiés par exsanguination sur héparine au niveau de l'aorte abdominale après avoir effectué une laparotomie.

Cette étude a été effectuée en 3 séries de 14 à 16 animaux chacune.

- **Paramètres étudiés**

Un **examen clinique** a été réalisé quotidiennement afin de rechercher les signes cliniques présentés dans le **Tableau 34**.

Tableau 34 : Signes cliniques

Signes comportementaux	Signes physiologiques
Prise de nourriture	Poids corporel (2 fois par semaine)
Prise d'eau	Troubles respiratoires ou gastro-intestinaux
Activité motrice (prostration, agitation, curiosité)	Lésions cutanées (présence, absence, aspect, nombre, localisation, évolution)
Réponse comportementale aux stimuli externes	Aspect du pelage et piloérection
Comportement de toilettage (absence ou réduction)	Yeux mi-clos
Grattage	Autres observations

Un **score clinique** a été établi en interne. Ce score a été mesuré deux fois par semaine. Il repose sur l'examen des lésions (type, nombre, forme, localisation), la repousse et l'aspect du poil ainsi que sur la présence ou non d'un pli cutané. Nous avons choisi de pondérer le score en fonction des lésions cutanées macroscopiques, critère qui nous semble cliniquement plus pertinent que les autres critères évalués. Il est ainsi possible de suivre, au cours du temps, la moyenne globale du score clinique individuel. Nous avons choisi de noter les lésions cutanées à partir de 3 lésions observées. En effet, des petites lésions non spécifiques, dues au rasage par exemple (que ce soit chez des animaux témoins ou non), peuvent apparaître. La valeur maximum pouvant être atteinte est 25 (description du score clinique avec photos, en **annexe 2**).

Les **paramètres mesurés** lors de cette étude apparaissent dans le **Tableau 35** :

- Numération Formule Sanguine (Automate MS4-S, Melet-Schloesing, Osny)
- Mesure de la créatinine plasmatique (Vitros Fusion 5.1 ; Laboratoire d'Analyses Médicales Diai, Sevran)
- Mesure du phosphore et fer plasmatique (Vitros DT II, Orthoclinical Diagnostics, Inc. USA)
- Dosage du Gd³⁺ plasmatique libre et du Gd total plasmatique, uniquement dans le groupe 4 (respectivement, CLHP-SM et spectrométrie de masse ; Service de Bioanalyse, Guerbet)
- Dosage du Gd total dans la peau (SM ; Service de Bioanalyse, Guerbet)
- Relaxométrie dans les biopsies de peau afin déterminer sous quelle forme est le Gd (relaxomètre Minispec®, Bruker 60MHz ; 1,42 Tesla)

- Histologie de la peau au sacrifice (coloration HES et coloration par le rouge sirius) (Pr. Bruneval, Hôpital Européen Georges Pompidou HEGP, Paris).

Pour les animaux de la **série 3**, nous n'avons pu effectuer les prélèvements de sang et les biopsies de peau à J21 comme initialement prévu lors de la rédaction du protocole, pour des raisons techniques. Ainsi, les prélèvements ont été effectués à **J22 au lieu de J21, soit un jour après l'arrêt de la nourriture enrichie en adénine**. Dans cette série 3, des dosages du **Gd³⁺ libre** et du **Gd total** ont été effectués dans le **plasma** à **J15 afin de documenter la présence de Gd³⁺ dissocié dans le plasma**, au lieu des dosages du fer et du phosphate plasmatique, effectués dans les séries 1 et 2. Ceci a concerné 6 rats recevant du NaCl 0,9% (groupe 1) et 9 rats recevant de l'adénine et le gadodiamide (groupe 4).

- **Analyse statistique**

Les données sont présentées avec leur écart-type (lorsque $n > 2$). L'analyse statistique a été réalisée en fonction des paramètres mesurés. Une analyse de la variance à mesures répétées à deux facteurs (interaction traitement x délai) a été choisie afin d'étudier l'évolution pondérale et les paramètres biochimiques. L'analyse statistique utilisée pour comparer l'effet produit sur la concentration en gadolinium total dans la peau dorsale est l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur (produit). Une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur (temps) a été utilisée pour comparer l'évolution de la constante de relaxivité r_1 *in vivo*. Si une interaction est détectée par le test ANOVA, une comparaison deux à deux est effectuée par le test de Bonferroni. L'intervalle de confiance à 95% de la valeur de la constante de relaxivité r_1 obtenue *in vivo* (moyenne $1.96 \pm$ SD) est calculé puis comparé à la valeur de la constante de relaxivité r_1 de référence obtenue *in vitro* $\pm 23\%$ (intervalle r_1 *in vitro*). Quand l'intervalle de confiance de la moyenne pour la valeur de la constante de relaxivité r_1 obtenue *in vivo* est incluse dans l'intervalle r_1 *in vitro*, l'état du gadolinium *in vivo* était considéré comme équivalent à l'état du gadolinium *in vitro* (c'est-à-dire sous sa forme complexée) ou, dans le cas contraire, comme différent (c'est-à-dire sous forme dissociée et soluble ou dissociée et précipitée). Une différence était considérée comme significative pour un risque alpha < 0.05 (*). Le logiciel utilisé est Graph Pad Prism[®] (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

Tableau 35 : Paramètres étudiés

	Semaine 1		Semaine 2					Semaine 3					Semaine 4					Semaine 5			
	J0	J7	J8	J9	J10	J11	J14	J15	J16	J17	J18	J21	J22	J23	J24	J25	J28	J29	J30	J31	J32
Adénine	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	X									
NaCl 0,9% ou gadodiamide IV		*	*	*	*	*															
Suivi clinique	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Score clinique			*			*				*	*	*				*	*				*
Poids corporel	*	*	*	*	*	*		*		*	*	*				*	*			*	*
Numération Formule Sanguine	*	*									*	*	*								*
Créatinine plasmatique	*	*									*	*	*								*
Fer, phosphate plasmatique	*	*						*			*	*	*								*
Gd ³⁺ libre + Gd total plasmatique (uniquement groupe 4)													(*)								
Relaxométrie peau		*										*	(*)								*
Gd total peau		*										*	(*)								*
Histologie peau																					*

6.3.2.3 Résultats

6.3.2.3.1 Evolution pondérale

La **Figure 73**, ci-dessous, présente l'évolution pondérale des animaux au cours du temps. Le poids corporel des rats recevant un régime alimentaire standard est significativement plus élevé que celui des groupes recevant un régime enrichi en adénine (groupe 3 vs. autres traitements : $p < 0,05$). En effet, dans les groupes recevant un régime enrichi en adénine, une perte de poids substantielle est observée au début de l'étude (entre J0 et J21). Une fois le régime enrichi en adénine arrêté, une augmentation du poids est notée jusqu'à la fin de l'étude. Au contraire, le groupe 3 a présenté une croissance pondérale régulière quoique ralentie durant la semaine d'injection de gadodiamide.

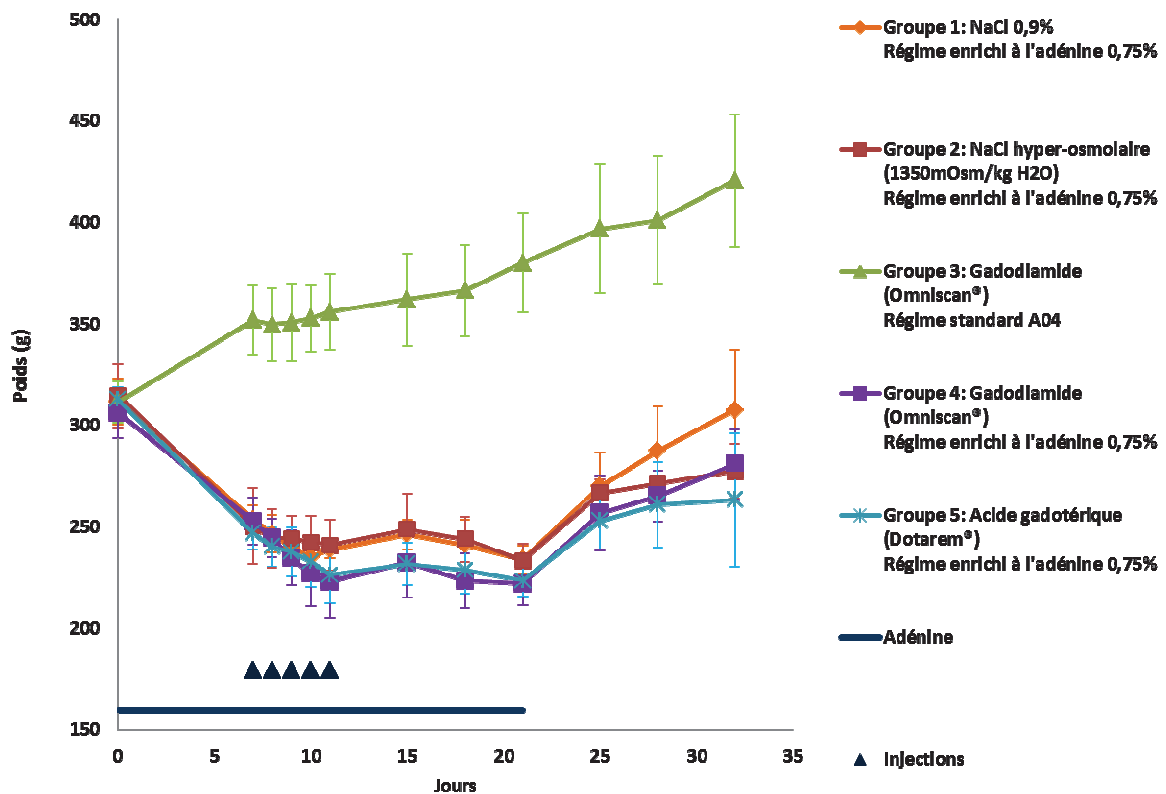


Figure 73: Evolution pondérale des différents groupes. Groupe 3 vs. autres traitements : $p < 0,05$ (*)

6.3.2.3.2 Evolution du score clinique

L'évolution du score clinique par groupe est présentée dans la **Figure 74**. Il s'agit d'une moyenne globale calculée à partir d'un score résumant l'ensemble des indicateurs pondérés en faveur des lésions. Le groupe 4, ayant reçu du gadodiamide et une alimentation enrichie en adénine, est le seul à présenter une élévation importante de ce score, liée à l'apparition de lésions cutanées macroscopiques chez plusieurs animaux.

Cependant, ce modèle a l'inconvénient de présenter une petite variabilité interindividuelle en ce qui concerne l'intensité et le délai d'apparition des lésions. Ainsi, au sein du groupe 4, trois rats sur quinze n'ont pas jamais développé de lésions cutanées macroscopiques et les

scores cliniques des autres animaux ont été variables (**Figure 75**). Néanmoins, quasiment toutes les lésions cutanées sont apparues avant la fin du régime enrichi en adénine. Quatre rats ont été euthanasiés avant la fin de l'étude pour des raisons éthiques car ils avaient atteint les points limites de l'étude (lésions cutanées très étendues et signes de prostration, activité nulle ou faible, perte de poids importante).

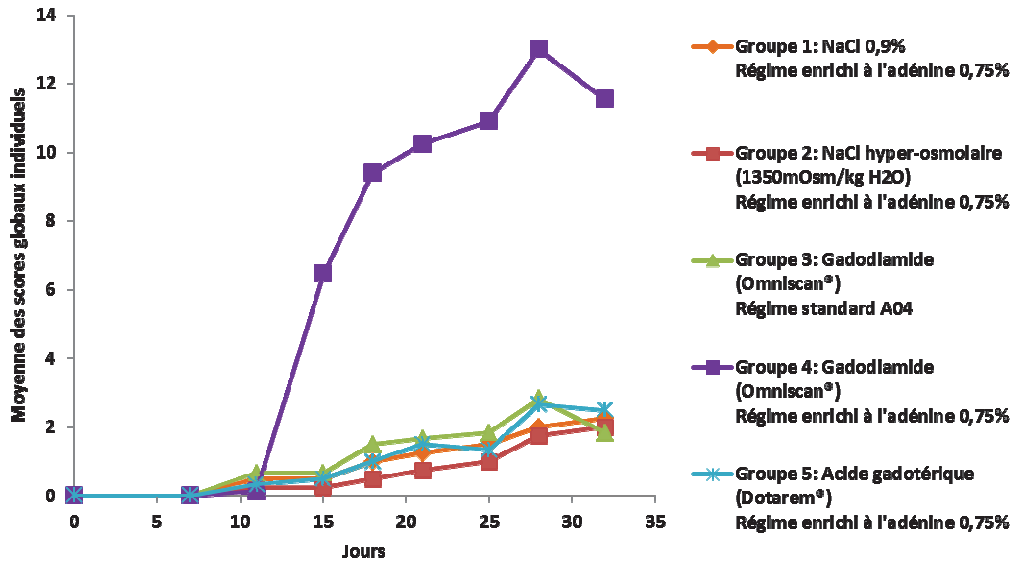


Figure 74 : Evolution du score clinique moyen par groupe, en fonction des traitements reçus entre J7 et J11 et du type de régime alimentaire reçu (groupes 1, 2, 4 et 5 : régime enrichi en adénine jusqu'à J21).

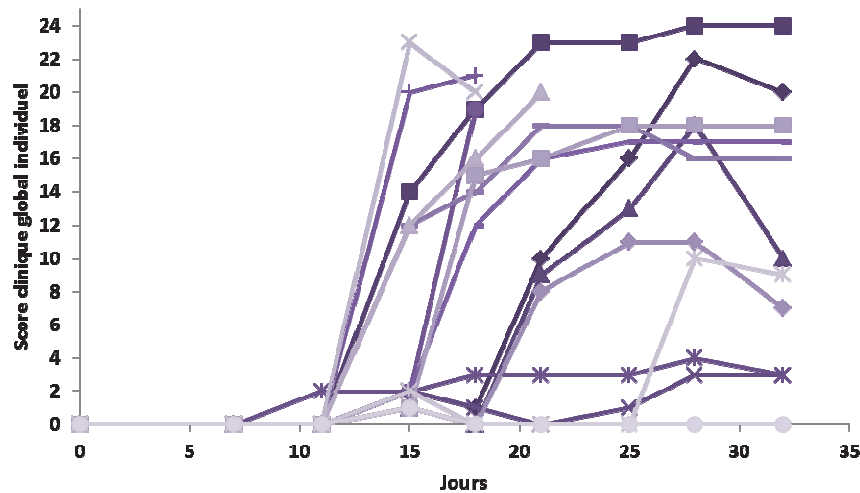


Figure 75 : Evolution du score clinique global individuel des rats du groupe 4 : régime enrichi en adénine jusqu'à J21 et administration de gadodiamide (n = 15).

6.3.2.3.3 Histologie

A J32, aucune lésion histologique n'a été observée dans la peau des rats des groupes 1, 2, 3 et 5. En revanche, chez les 11 rats survivants à J32 du groupe 4 (gadodiamide et régime enrichi en adénine), 6 animaux ont présenté des biopsies de peau jugées anormales. Une

inflammation a été observée chez ces 6 rats et une fibrose a été notée chez 3 animaux. Un exemple de fibrose associée à une inflammation importante est présenté dans la **Figure 76** ci-dessous (Pr. Bruneval, HEGP, Paris).

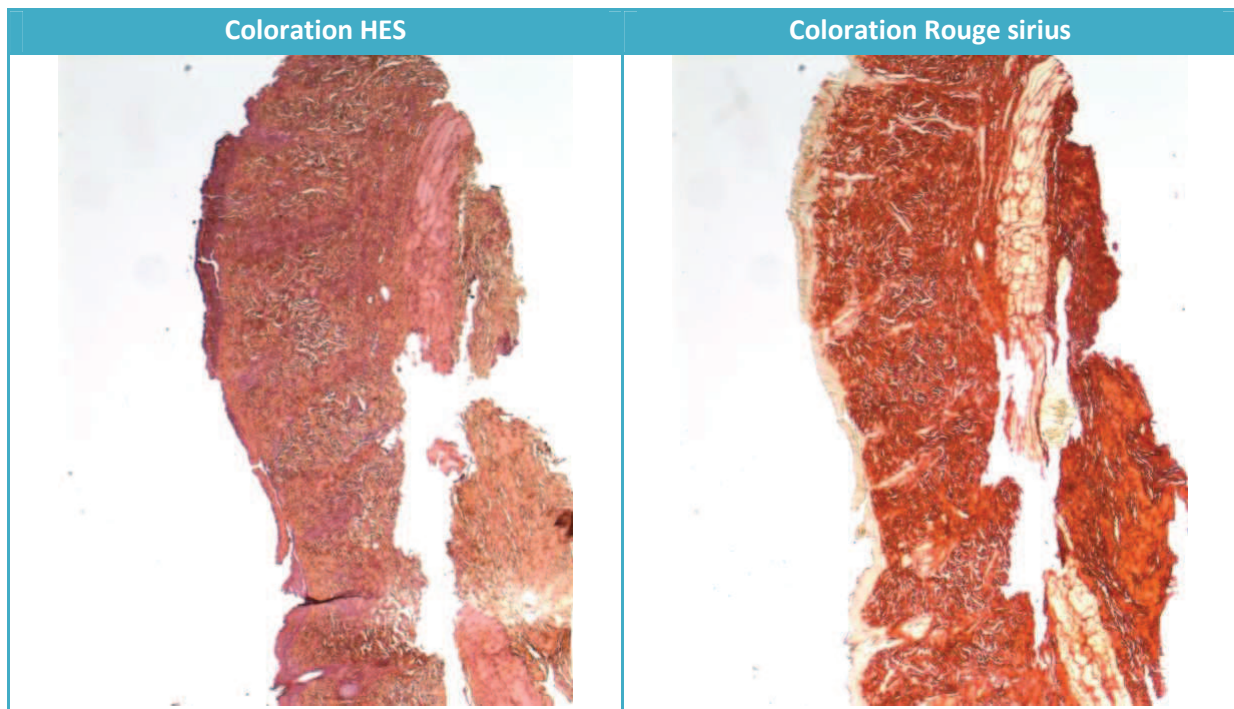


Figure 76 : Exemple d'analyse histologique (colorations HES et rouge sirius) de la peau dorsale du rat 24, ayant reçu du gadodiamide et un régime enrichi en adénine. La coloration au Rouge sirius fait apparaître la présence de collagène dans le derme (grossissement x 2,5)

6.3.2.3.4 Hématologie

- **Leucocytes totaux**

Aucune différence intergroupe n'a été observée en ce qui concerne les différentes populations de leucocytes en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 ou du type de nourriture reçue durant les trois premières semaines de l'étude.

- **Erythrocytes**

Après une légère augmentation à J7, une diminution a été observée pour tous les groupes recevant une alimentation enrichie en adénine (**Figure 77**).

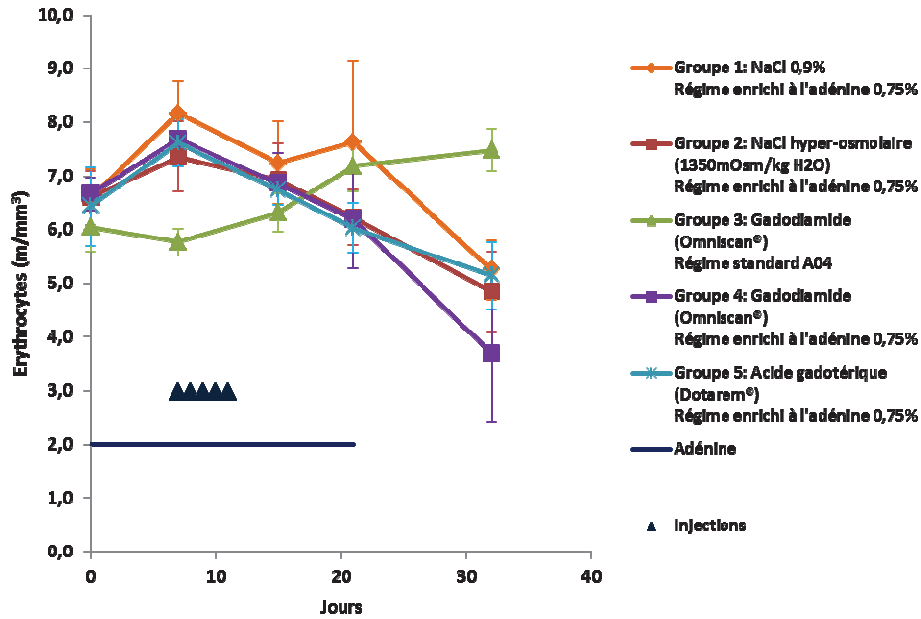


Figure 77 : Evolution des érythrocytes en fonction des différents traitements administrés entre J7 et J11 et de la nourriture reçue pendant les trois premières semaines (Non Significatif, NS).

• **Hématocrite**

La valeur du taux d'hématocrite a diminué tout au long de l'étude pour les groupes recevant un régime enrichi en adénine ($p < 0,001$ à J32 vs. J0) (Figure 78). Bien que la puissance statistique ne soit pas suffisante pour le démontrer, la diminution du taux d'hématocrite tend à être plus importante dans le cas du groupe 4. La valeur du taux d'hématocrite est restée stable dans le groupe 3.

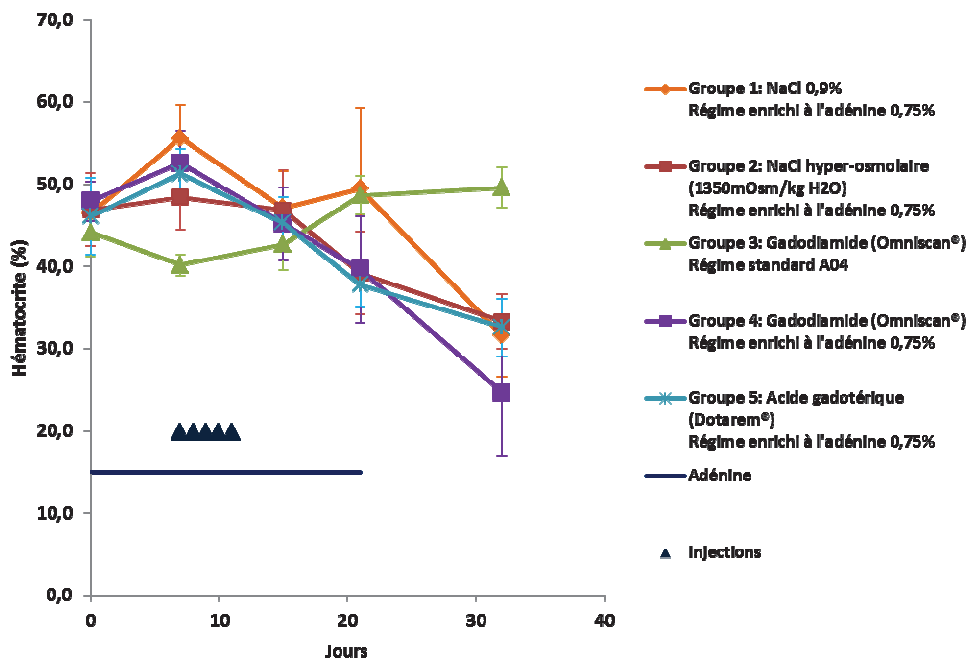


Figure 78 : Evolution du taux d'hématocrite en fonction des traitements et de l'alimentation reçue pendant les 3 premières semaines de l'étude (groupes 1, 2, 4 et 5 : $p < 0,001$ (***) J0 vs. J32).

• **Hémoglobine**

Une diminution de la concentration d'hémoglobine est observée chez les groupes ayant reçu un régime alimentaire enrichi en adénine ($p < 0,001$ J0 vs. J32) contrairement au groupe 3 ayant reçu une alimentation standard (NS) (**Figure 79**).

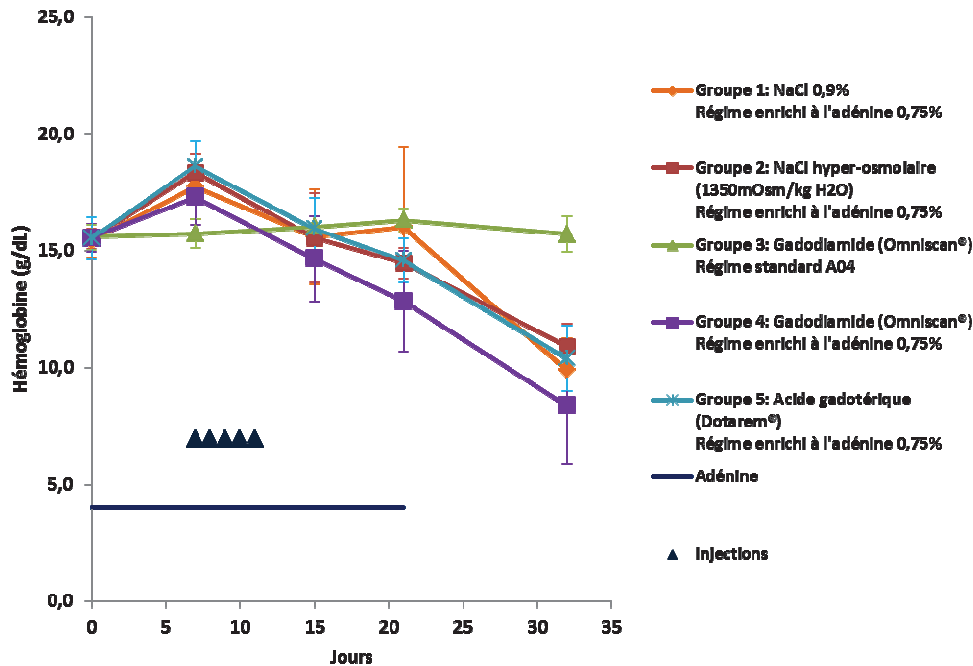


Figure 79 : Evolution de hémoglobinémie en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude, J0 à J21, (groupes 1, 2, 4 et 5 : $p < 0,001$ (***) J0 vs. J32).

• **Volume Globulaire Moyen (VGM), Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH), Plaquettes**

Aucune modification de ces paramètres n'a été observée, quel que soit le groupe ou le délai.

6.3.2.3.5 Biochimie

• **Créatinine plasmatique**

Ces résultats sont présentés dans la **Figure 80** ci-dessous.

En raison de problèmes techniques, certains échantillons n'ont pu être analysés (principalement à J21), entraînant un manque de puissance statistique, notamment pour le groupe 4.

La créatininémie est significativement plus élevée à J21 et à J32 pour tous les groupes ayant reçu un régime alimentaire enrichi en adénine par rapport au groupe ayant reçu un régime standard ($p < 0,01$).

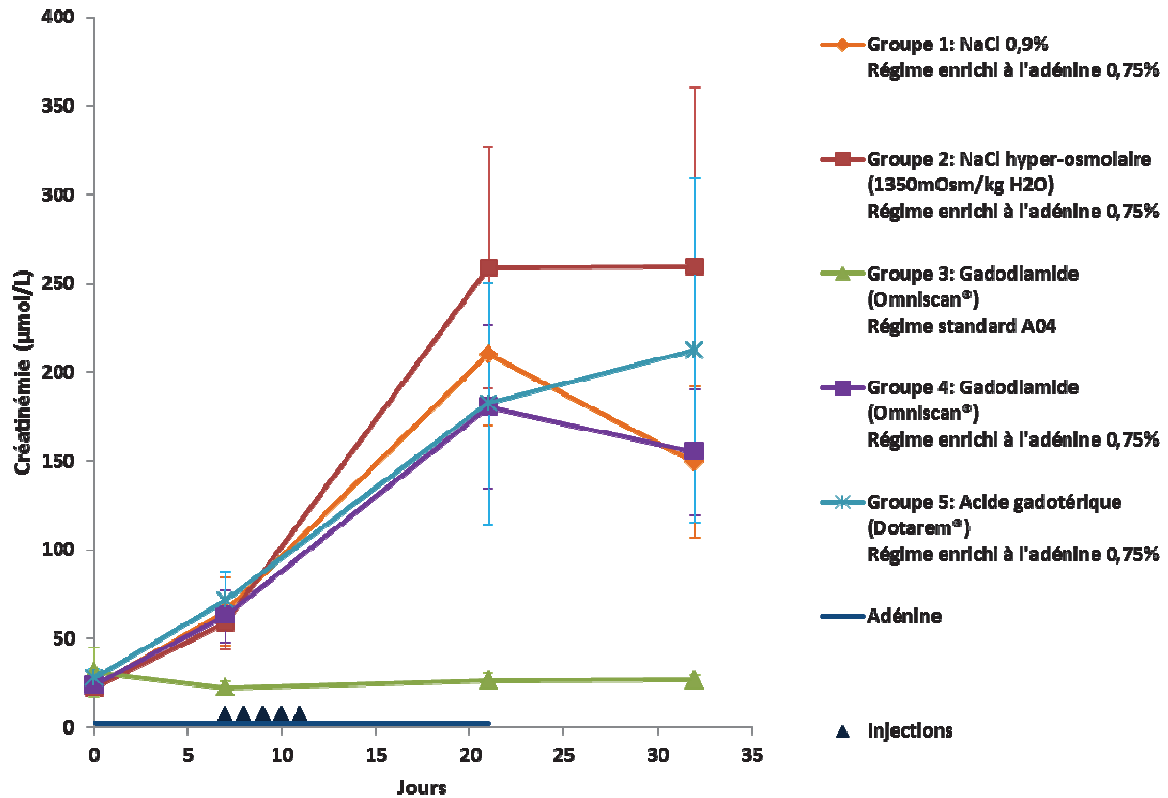


Figure 80 : Evolution de la créatininémie en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude (J0 à J21) ; Groupe 3 (gadodiamide, régime standard) = $p < 0.01$ (**) vs. tous les groupes à J21 et à J32.

- **Fer plasmatique**

Une diminution homogène des concentrations de fer plasmatique des groupes ayant reçu une alimentation enrichie en adénine est notée à J7. Cette concentration s'est stabilisée ensuite jusqu'à J21 pour les rats des séries 1 et 2. Néanmoins, chez les rats de la série 3 où le prélèvement de sang a été effectué à J22 au lieu de J21, le fer plasmatique est augmenté par rapport à J7 (**Figure 81**) contrairement aux rats des séries précédentes où le prélèvement a été effectué à J21 (**Figure 82**). Par conséquent, il n'est pas possible d'interpréter les données issues des rats de la série 3 avec celles des séries 1 et 2.

Pour les séries 1 et 2, l'analyse de la variance à deux facteurs avec mesures répétées indique une interaction entre la sidérémie et le délai de mesure. En effet, la diminution de la sidérémie chez les rats ayant reçu un régime enrichi en adénine (vs. J0) est statistiquement significative jusqu'à J21 ($p < 0,001$). Après 11 jours sous régime standard (J32), cette concentration tend à revenir aux valeurs de prétraitement (NS vs. J0) (**Figure 81**). En revanche, à J22, soit un jour après l'arrêt du régime enrichi en adénine, la concentration de fer plasmatique est revenue aux valeurs prétraitement (J22 vs. J0, NS) (**Figure 82**) (série 3). Aucun effet statistiquement significatif lié aux traitements n'a donc été mis en évidence.

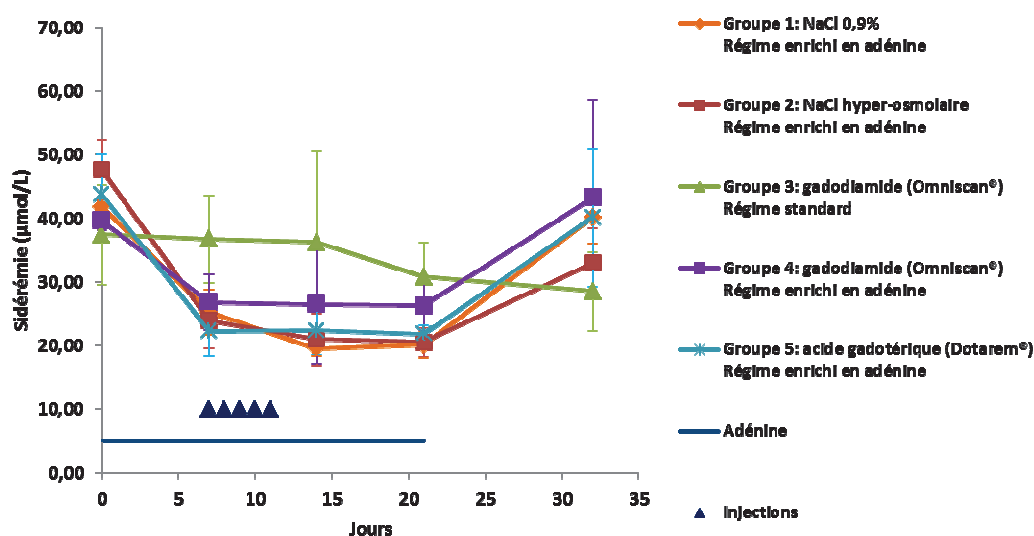


Figure 81 : Evolution de la sidérémie en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude.

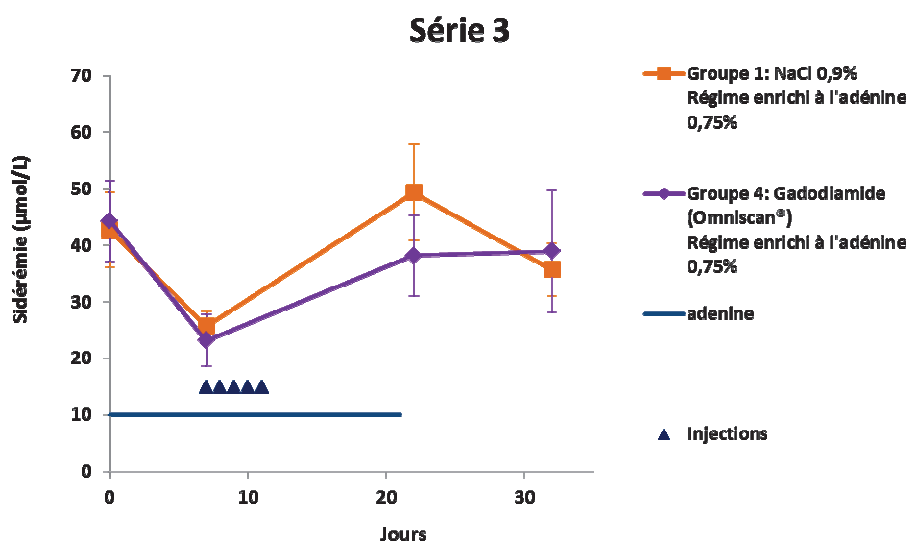


Figure 82 : Evolution de la sidérémie des rats de la série 3 en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 (prélèvement à J22 au lieu de J21)

- **Phosphate plasmatique**

Chez les animaux recevant un régime enrichi en adénine, la phosphatémie a augmenté à J21 ($p < 0.01$ pour le groupe 2 vs. les valeurs prétraitement ; NS pour tous les autres groupes) chez les rats des séries 1 et 2 (**Figure 83**) alors qu'au contraire, à J22 (soit un jour après l'arrêt du régime enrichi en adénine), une diminution de la phosphatémie a été observée (**Figure 84**). Les résultats de la phosphatémie diffèrent donc entre J21 et J22. Par conséquent, il n'est pas possible d'interpréter les données des rats de la série 3 avec ceux

des séries 1 et 2. Pour tous les rats, au délai J32, la phosphatémie revient à une valeur proche des valeurs de prétraitement.

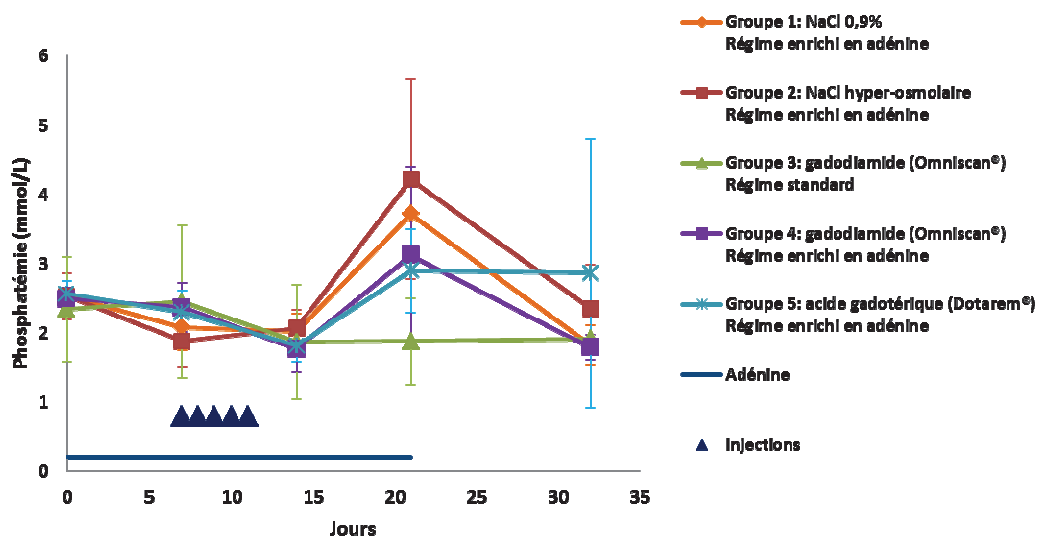


Figure 83 : Evolution de la phosphatémie en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude.

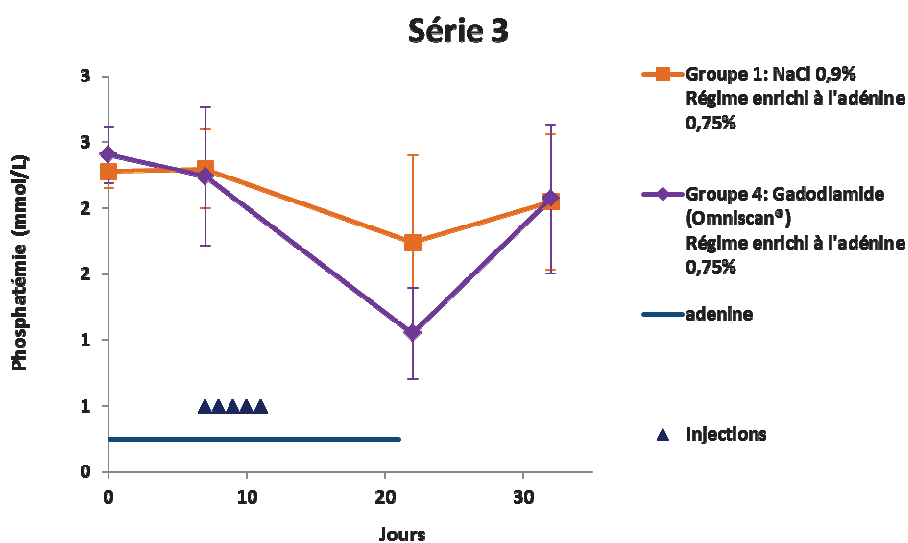


Figure 84 : Evolution de la phosphatémie des rats de la série 3 en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 (prélèvement à J22)

En regroupant les valeurs individuelles de tous les groupes des séries 1 et 2, il apparaît que la phosphatémie est significativement liée à la concentration plasmatique de créatinine (Figure 85).

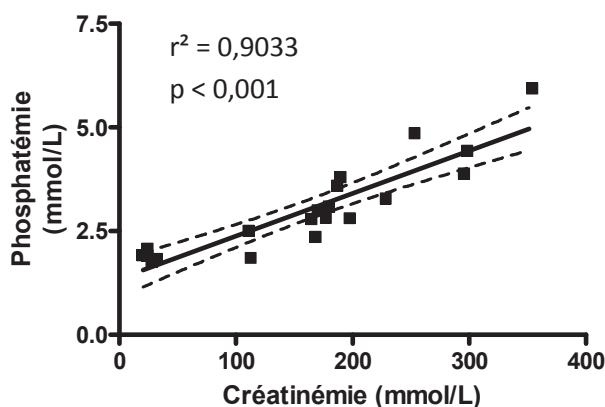


Figure 85 : Corrélation linéaire positive entre la concentration de créatinine plasmatique et la phosphatémie à J21 (séries 1 et 2).

6.3.2.3.6 Concentration de Gd^{3+} libre et Gd total plasmatique

Le dosage du Gd^{3+} libre dans le plasma n'a été effectué que chez 9 rats du groupe 4 (gadodiamide + régime enrichie en adénine).

Chez ces animaux, la concentration de Gd^{3+} libre était de $8,0 \pm 2,8 \mu\text{mol/L}$ alors que celle de Gd total était de $7,7 \pm 2,5 \mu\text{mol/L}$ dans le plasma. Par conséquent, 100% du Gd présent dans le plasma des rats était sous sa forme dissociée.

6.3.2.3.7 Concentration de Gd total dans la peau

Le dosage de la concentration de gadolinium total présent dans la peau nous permet de comparer la rétention du gadolinium dans les tissus en fonction des différents groupes. Chez les animaux insuffisants rénaux ayant reçu le gadodiamide, la concentration de Gd total dans la peau à J21 ou J22 et à J32 était significativement supérieure à celle mesurée pour tous les autres groupes ($p < 0,001$) (Figure 86).

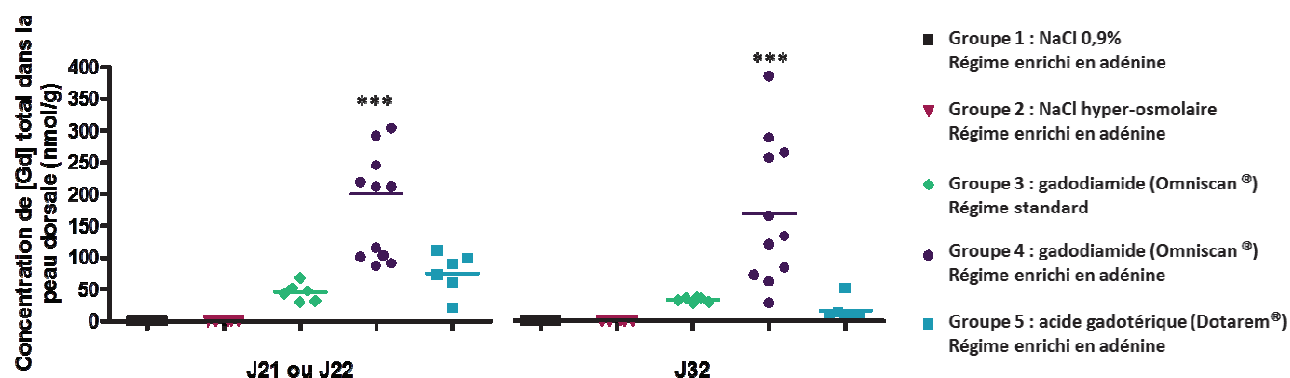
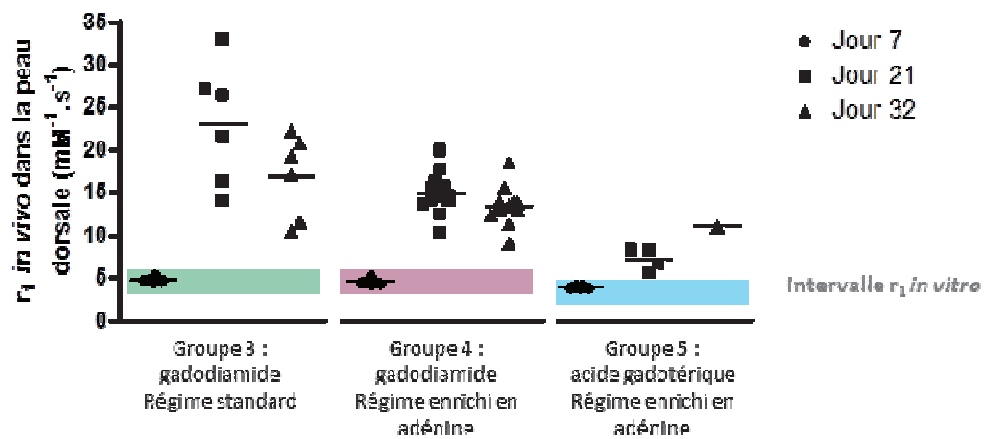


Figure 86 : Concentration de gadolinium total dans la peau par groupe en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude ; Groupe 4 = $p < 0,001$ (***) vs. tous les groupes.

6.3.2.3.8 Relaxométrie

Les résultats des mesures de relaxométrie apparaissent dans la Figure 87 ci-dessous.

A J7, les biopsies étant réalisées 5 minutes après l’injection, les valeurs de r_1 sont la référence *in vivo*. La moyenne des valeurs de relaxivité r_1 *in vivo* augmente à J21 ou J22 et à J32 *versus* J7 pour le gadodiamide ($p < 0,01$). D’une manière générale, la valeur du r_1 *in vivo* de l’acide gadotérique (groupe 5) est inférieure à celle du gadodiamide (groupes 3 et 4). Le r_1 mesuré *in vivo* pour les rats ayant reçu de l’acide gadotérique (groupe 5) a augmenté mais de manière moins prononcée que pour ceux ayant reçu le gadodiamide (groupes 3 et 4). Une analyse statistique par mesure répétée n’a pas pu être réalisée pour le groupe ayant reçu l’acide gadotérique (groupe 5). En effet, pour ce groupe, la valeur du r_1 n’était calculable que pour un seul rat à J32, à cause d’une présence de gadolinium trop faible dans la peau pour les autres animaux.



Nombre de rats survivants	6/6/6	15/13/11	6/6/6
Nombre de rats mesurables (> LOQ)	6/6/6	15/13/11	6/4/1
Nombre total de rats	6/6/6	15/13/11	6/6/6

Figure 87 : Evolution temporelle de la constante de relaxivité r_1 dans la peau dans le temps en fonction du complexe de gadolinium (administré entre J7 et J1) ainsi que du régime alimentaire reçu jusqu’à J21.

6.3.2.3.9 Analyse détaillée du groupe 4 : gadodiamide et régime alimentaire enrichi en adénine

A titre indicatif, nous avons comparé la phosphatémie des rats des séries 1 et 2 du groupe 4 ayant présenté des lésions ($n=4$) à ceux des rats n’en ayant jamais développé ($n=2$).

L’hyperphosphatémie observée à J21 semble plus marquée chez les rats ayant présenté des lésions cutanées macroscopique (**Figure 88**). En effet, le score clinique du groupe 4 est corrélé à la concentration de phosphate plasmatique à J21 (**Figure 89**). Cependant, il convient de souligner que, *stricto sensu*, aucune conclusion ne peut être formellement tirée, en raison du faible échantillonnage.

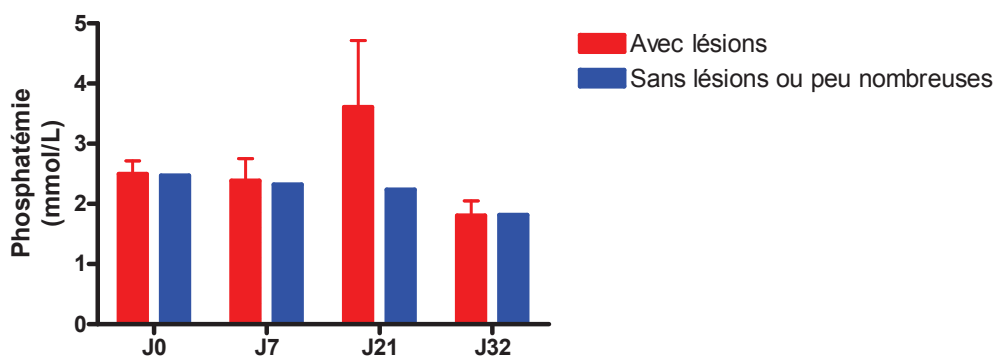


Figure 88 : Evolution de la phosphatémie (uniquement séries 1 et 2) en fonction de la présence de lésions macroscopiques au sein du groupe 4 ayant reçu le gadodiamide de J7 à J11 et un régime alimentaire enrichi en adénine de J0 à J21.

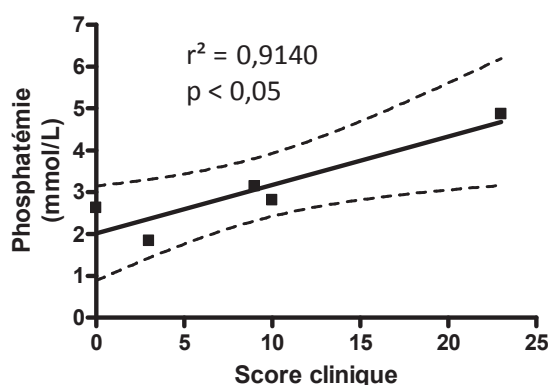


Figure 89 : Corrélation linéaire positive entre le score clinique et la phosphatémie à J21 (séries 1 et 2, n = 5).

Au sein du groupe 4, la concentration de gadolinium dans la peau à J32 était significativement plus importante chez les rats présentant des lésions cutanées macroscopiques (Figure 90) et est corrélée au score clinique (Figure 91). A J21 ou J22, le dosage de Gd total n'a pas été effectué au même délai mais le même phénomène est observé : la concentration de Gd total était supérieure chez les rats ayant présenté des lésions macroscopiques (Figure 92) et était corrélée à l'intensité et au nombre de lésions (Figure 93).

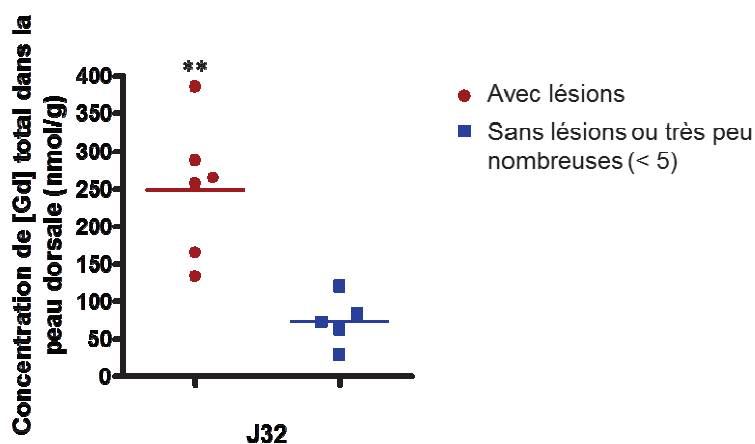


Figure 90 : Concentration de gadolinium total dans la peau à J32 en fonction de la présence ou de l'absence de lésions au sein du groupe 4 ayant reçu du gadodiamide de J7 à J11 et un régime enrichi en adénine de J0 à J21.

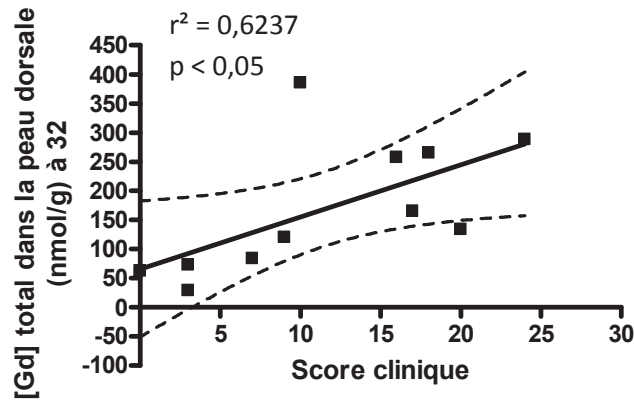


Figure 91 : Corrélation linéaire positive entre le score clinique et la concentration de Gd total dans la peau dorsale à J32.

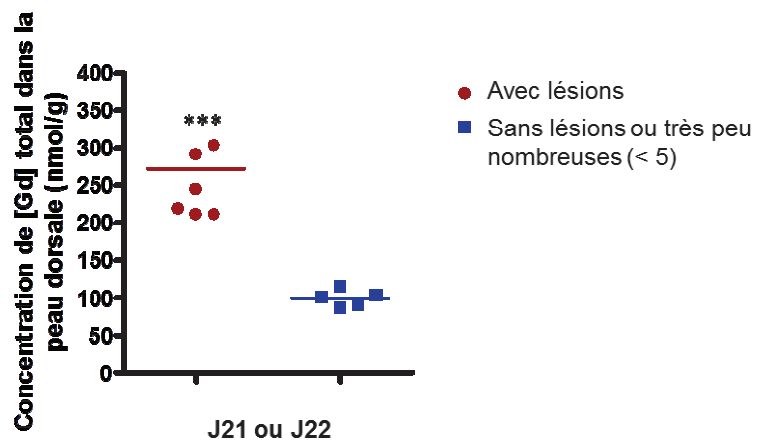


Figure 92 : Concentration de gadolinium total dans la peau à J21 ou J22 en fonction de la présence ou de l'absence de lésions au sein du groupe 4 ayant reçu du gadodiamide de J7 à J11 et un régime enrichi en adénine de J0 à J21

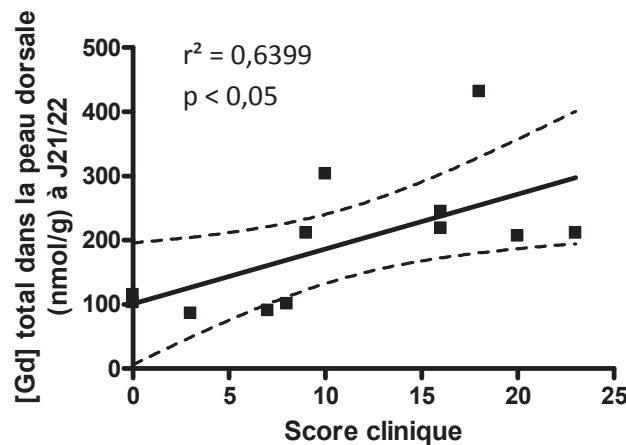


Figure 93 : Corrélation linéaire positive entre le score clinique et la concentration de Gd total dans la peau dorsale à J21 ou J22.

6.3.2.4 Conclusion

Ce nouveau modèle d'insuffisance rénale est associé une **importante augmentation de la créatinémie** jusqu'à l'arrêt du régime enrichi en adénine. Cette augmentation de la créatininémie **reste stable** jusqu'à la fin de l'étude. Par ailleurs, ce modèle est associé à une **anémie tardive** à une **diminution** significative de la concentration de **fer plasmatique** tout au long de la durée du régime. Nous avons observé également une **hyperphosphatémie** après trois semaines de régime enrichi en adénine (à J21), qui est corrélée avec le degré d'insuffisance rénale.

Nous avons également souhaité documenter l'effet de deux types de CGs sur ce modèle. Nous avons donc utilisé **un CG macrocyclique ionique**, l'acide gadotérique (Dotarem®), et **un CG linéaire non ionique**, le gadodiamide (Omniscan®).

Seuls les rats rendus insuffisants rénaux et ayant reçu le gadodiamide ont présenté une **élévation importante du score clinique**, principalement en raison de l'apparition de lésions cutanées macroscopiques. Aucune lésion cutanée n'a été observée chez les rats des groupe témoins ou ayant reçu l'acide gadotérique. De plus, l'analyse histologique a montré la présence d'ulcérations épidermiques, d'inflammation et de fibrose du derme uniquement chez les rats ayant développé des lésions cutanées macroscopiques et donc chez les rats ayant reçu du gadodiamide.

Par ailleurs, nos données montrent une **rétenion de gadolinium statistiquement plus importante** dans la peau chez **les rats insuffisants rénaux** ayant reçu du **gadodiamide** par rapport aux rats non-insuffisants rénaux et par rapport aux rats ayant reçu l'acide gadotérique.

Nos données nous permettent également de démontrer un **lien statistiquement significatif** entre la **concentration de gadolinium total** dans la peau et **l'intensité des lésions cutanées** (score clinique). En effet, les rats n'ayant pas présenté de lésions cutanées avaient une concentration de gadolinium total dans la peau inférieure à celle mesurée chez les animaux en ayant développé, et quasiment équivalente à celle mesurée dans la peau des rats ayant reçu le CG macrocyclique, l'acide gadotérique.

Nos données indiquent aussi que **100%** du gadolinium total dosé dans le plasma 4 jours après la dernière administration est **sous forme libre** chez les rats ayant reçu du **gadodiamide**.

Enfin, nous avons observé une **augmentation significative de la valeur de r_1** à J21/22 et J32 par rapport à J7, ce qui suggère une dissociation de ce produit. Le r_1 apparent de **l'acide gadotérique** est **inférieur** à celui du gadodiamide. L'acide gadotérique se dissocie donc clairement moins que le gadodiamide.

Un autre objectif de cette étude concernait les effets de **l'hyperosmolalité** sur la fonction rénale et les paramètres biochimiques chez des animaux insuffisants rénaux. **Aucun effet**

significatif n'a été observé sur les paramètres mesurés en comparant les groupes NaCl 0,9% et NaCl hyperosmolaire.

Les résultats de cette étude seront discutés et confrontés à la littérature dans le chapitre « Discussion générale » de la thèse.

Chapitre 7 : APPROCHE PHARMACOLOGIQUE DE LA FIBROSE SYSTEMIQUE NEPHROGENIQUE

7.1 Approche pharmacologique de la signalisation impliquée dans les effets du gadodiamide sur un modèle d'insuffisance rénale modérée (partie 1)

7.1.1 Introduction

Le **TGFβ** est une cytokine **pro-fibrosante**, qui joue un rôle essentiel dans la fibrose. Elle augmente la synthèse et l'expression des protéines de la MEC, et notamment le **collagène**, en **inhibant** sa **dégradation**, *via* l'augmentation de TIMP-1, un inhibiteur d'une collagénase, et en induisant la **prolifération** des fibroblastes et leur **différenciation** en myofibroblastes (voir notamment le paragraphe 1.4.2.1 TGFβ1). Il existe deux voies de signalisation du TGFβ : la **voie canonique SMAD-dépendante**, qui implique les protéines SMADs et notamment P-SMAD 2 et P-SMAD 3, et les voies non-canoniques, SMAD-indépendantes.

Dans de nombreuses fibroses, TGFβ est surexprimé et la voie de signalisation SMAD-dépendante est également dérégulée (augmentation de la phosphorylation des SMADs 2 et 3 et leur accumulation nucléaire) (Javelaud et Mauviel, 2004). **TGFβ** est donc un **acteur essentiel** de la fibrose et cette **cible thérapeutique** fait l'objet de nombreux travaux (Akhurst et Hata, 2012).

Une **surexpression** de TGFβ1 a été observée, par immunohistochimie, dans la peau des rats traités avec le **gadodiamide** chez des rats insuffisants rénaux (Fretellier et coll., 2012 ; Fretellier et coll., 2013). Par ailleurs, l'implication de la voie du TGFβ et des SMADs **chez des patients souffrant de FSN** a déjà été montrée dans des études cliniques (Jiménez et coll., 2004 ; Kelly et coll., 2008 ; Schieren et coll., 2010).

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier plus spécifiquement l'implication de la voie du TGFβ chez des rats traités avec le gadodiamide afin de mieux comprendre le mécanisme profibrosant de ce CG.

Nous avons choisi une **approche pharmacologique**, en choisissant un médicament qui possède des **propriétés anti-TGFβ, le paclitaxel**.

Le **paclitaxel** est un anti-cancéreux (vendu sous le nom de Taxol[®] ; alcaloïde dérivé de l'écorce de l'if *Taxus brevifolia*), appartenant à la classe des taxanes. En cancérologie, le paclitaxel est essentiellement utilisé dans le traitement du cancer du poumon, du cancer du sein et du cancer de l'ovaire.

Le mécanisme d'action anti-tumoral exact du paclitaxel est mal connu. C'est un **poison du fuseau**. Il se fixe et stabilise les microtubules. Les microtubules ont une fonction capitale dans la formation du fuseau mitotique avant la division cellulaire. Le paclitaxel stimule l'assemblage des microtubules, des dimères de tubuline puis, il en empêche leur

dépolymérisation et leur désassemblage. Ainsi, sous l'effet du paclitaxel, le cytosquelette des cellules est réorganisé. De plus, les microtubules non associés aux centrosomes se déploient de façon anormale. Par conséquent, les cellules sont incapables de former un fuseau mitotique normal. Le paclitaxel permet ainsi d'inhiber la prolifération cellulaire (Horwitz, 1992).

Certaines études précliniques ont montré que le paclitaxel, **à faibles doses, inhibe la phosphorylation de SMAD 2 et de SMAD 3**, deux molécules impliquées dans la voie de signalisation de TGF β , aboutissant à une diminution du dépôt de collagène et donc à l'inhibition de la fibrose (Liu et coll., 2005 ; Zhang et coll., 2010). Au contraire, à fortes doses le paclitaxel induit des lésions ressemblant à celles de la sclérose systémique (De Angelis et coll., 2003 ; Kupfer et coll., 2003).

Notre objectif consistait en l'étude **spécifique de la voie du TGF β** (SMAD-dépendante) chez des rats traités avec le gadodiamide afin de mieux comprendre le mécanisme pro-fibrosant de cette molécule.

Nous avons choisi de tester les effets **curatifs** d'une faible dose de paclitaxel sur les lésions induites par le gadodiamide.

7.1.2 Matériel et méthodes

- **Animaux**

L'expérimentation a été réalisée chez 44 rats mâles Wistar (CERJ) de 6 semaines (poids 200-220g). Les animaux sont strictement similaires à ceux utilisés dans nos études précédentes.

- **Produits testés:**

L'étude a compris 4 groupes.

Tableau 36 : Groupes et produits injectés (DMSO : Diméthylsulfoxyde)

Groupe	Produits	Nom commercial	Fournisseur	Concentration	Dose	Volume injecté	n
1	NaCl	-	Lavoisier	9 g/L	-	5 mL/kg	8
	DMSO	-	Sigma	-		0,6 mL mL/kg	
2	NaCl	-	-	9 g/L	0,3 mg/kg	5 mL/kg	8
	Paclitaxel	-	VWR	0,5 mg/mL		0,6 mL mL/kg	
3	Gadodiamide	Omniscan [®]	GE	500 mM	2,5 mmol/kg	5 mL/kg	12
	DMSO	-	Sigma	-		0,6 mL mL/kg	
4	Gadodiamide	Omniscan [®]	GE	500 mM	2,5 mmol/kg	5 mL/kg	16
	Paclitaxel	-	VWR	0,5 mg/mL		0,3 mg/kg	

NB : L'élimination du paclitaxel est principalement hépatique. Une étude (Jiko et coll., 2005) chez le Rat a montré que l'insuffisance rénale perturbe faiblement la pharmacocinétique du

paclitaxel (excrétion hépatique principalement). Par conséquent, nous avons choisi de conserver la dose de 0,3 mg/kg, le protocole d'administration (deux fois par semaine) et la voie d'administration (intrapéritonéale [IP]) utilisés dans la littérature (Zhang et coll., 2010).

• **Réalisation de l'expérimentation**

Tous les animaux ont été rendus insuffisants rénaux par ajout d'adénine dans l'alimentation (0,75%) pendant deux semaines (J0 à J15).

Le gadodiamide ou le NaCl 0,9% (témoin) ont été injectés par voie intraveineuse dans la veine caudale avec un système Insyte® et de perfusion à 1 mL/mn durant la 2^e semaine du régime enrichi en adénine (J7 à J11). Les administrations par voie intrapéritonéale de paclitaxel ou de DMSO (solvant du paclitaxel, témoin) ont été effectuées de J36 à J53 à raison de deux fois par semaine. Les animaux ont été euthanasiés à J58 par exsanguination au niveau de l'aorte abdominale sous anesthésie générale.

Le synoptique de l'étude apparaît dans la **Figure 94** ci-dessous :

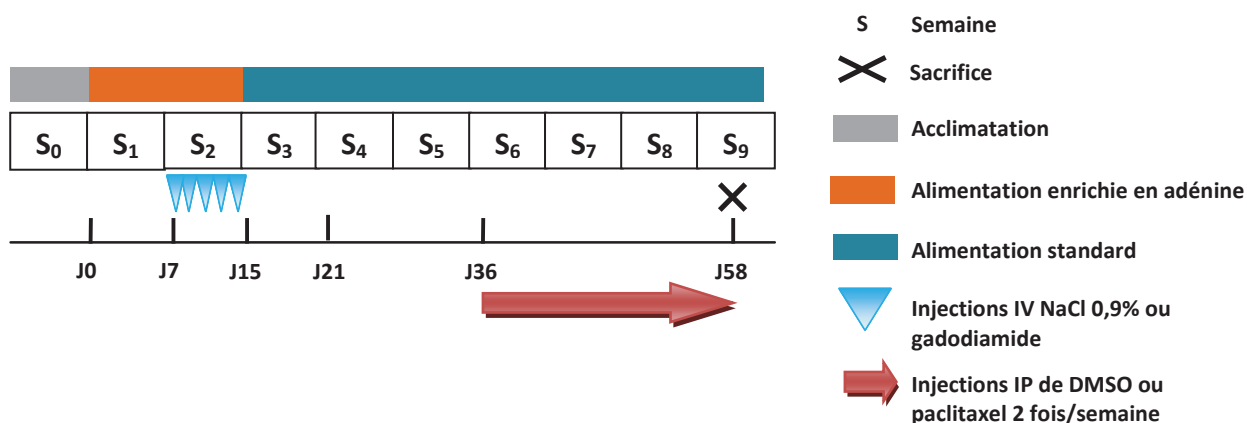


Figure 94 : Synoptique de l'étude

Les prélèvements sublinguaux, les biopsies cutanées, les injections IV et les euthanasies ont été effectués sous anesthésie par l'isoflurane (induction 3,5% puis maintien à 2,5%) supplémentée à 1 L/mn d'oxygène.

NB : Le paclitaxel est considéré comme un produit nocif ; il fait partie de la classe des agents Cancérigènes Mutagènes Reprotoxiques.

Cette étude a été effectuée en 3 séries de 14 ou 15 animaux.

• **Paramètres étudiés**

Un **examen clinique** est réalisé quotidiennement afin de rechercher divers signes cliniques (**Tableau 34**).

Un **score clinique**, préalablement en interne, est réalisé deux fois par semaine.

Les **paramètres mesurés** lors de cette étude apparaissent dans le **Tableau 37** :

- Numération Formule Sanguine (Automate MS4-S, Melet-Schloesing, Osny)
- Mesure de la créatinine plasmatique (Vitros Fusion 5.1 ; Laboratoire d'Analyses Médicales Diai, Sevrans)
- Dosage du Gd total dans la peau, le foie, le fémur, le rein, la rate (SM ; Service de Bioanalyse, Guerbet)
- Histologie de la peau (réalisée par le Pr. Bruneval, HEGP, Paris et par le Dr. Gadot, société ANIPATH, Lyon) :
 - o L'histologie classique des coupes de peaux dorsales a été évaluée par la coloration HES. La matrice extracellulaire et plus précisément le collagène a été mise en évidence par le rouge Sirius.
 - o Immunohistochimie : ED-1 (macrophages), TIMP-1 (inhibiteur d'une collagénase), TGF β 1 (marqueur pro-fibrosant), P-SMAD 3 (protéine impliquée dans la voie de signalisation SMAD-dépendante du TGF β).
 - o Suite à la description histologique effectuée par notre histopathologiste (Pr. Bruneval, HEGP, Paris), nous avons évalué semi-quantitativement les données (+ : faible ou rare ; ++ : modéré ; +++ : nombreux, sévère ou important).
 - o Mesure de la cellularité dans le derme (logiciel Histolab [Microvision, France, version 6.2.0]).

- **Analyse statistique**

Les données sont présentées (lorsque $n > 2$) avec leur écart-type. L'analyse statistique a été réalisée en fonction des paramètres mesurés. Une analyse de la variance à mesures répétées à deux facteurs (interaction traitement x délai) a été choisie afin d'étudier l'évolution pondérale, les paramètres biochimiques et hématologiques. Nous avons étudié l'effet produit sur la concentration en gadolinium total tissulaire au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur (produit). Une différence est considérée comme significative pour un risque $\alpha < 0.05$. Le logiciel utilisé a été Graph Pad Prism[®] (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

Tableau 37 : Paramètres étudiés

	Sem 1				Sem 2				Sem 3				Sem 4				Sem 5				Sem 6				Sem 7				Sem 8				Sem 9					
	J0	J7	J8	J9	J10	J11	J14	J15	J16	J17	J18	J21	J22	J25	J28	J32	J35	J36	J37	J38	J39	J42	J43	J44	J45	J46	J49	J50	J51	J52	J53	J56	J57	J58				
Adénine	*	*	*	*	*	*	*																															
NaCl à 0,9% ou gadodiamide IV		*	*	*	*	*																																
DMSO ou paclitaxel IP																																						
Suivi clinique	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Score clinique																																						
Poids corporel	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Numération Formule Sanguine	*	*										*																									*	
Créatinine plasmatique	*	*						*				*																									*	
Gd total peau		*															*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Histologie peau (HES)		*																																			*	
Cellularité dans le derme																	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Immunohistochimie peau (TIMP-1, ED-1, TGFβ, P-SMAD 3)																	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Gd total foie, rein, rate, fémur																																					*	

7.1.3 Résultats

7.1.3.1 Evolution pondérale

Aucune différence n'a été observée entre les groupes.

7.1.3.2 Score clinique

Un rat du groupe témoin NaCl 0,9 % + DMSO a présenté une lésion cutanée macroscopique à partir de J46, qui a semblé liée à l'infection d'une biopsie cutanée.

Aucune lésion cutanée n'est apparue chez les autres rats des deux groupes témoins.

Un rat ayant reçu du gadodiamide (groupe 4) a été retrouvé mort à J14 (soit 3 jours après la dernière administration).

Après administration de gadodiamide, une élévation importante du score clinique, liée à l'apparition de lésions cutanées macroscopiques, a été mise en évidence chez 15 rats sur 27. Dès la première administration de paclitaxel, le score clinique a chuté chez tous les animaux et est resté stable à partir de la 4^e injection, sauf pour deux rats (**Figure 96**). Un de ces deux rats présentait des lésions cutanées très importantes avant le début du traitement, le paclitaxel a permis une diminution très importante des lésions macroscopiques mais au sacrifice (J58), des petites lésions cutanées persistaient (**Figure 95**). Au final, avant le début des administrations de paclitaxel (J36), 7 rats sur 15 présentaient des lésions cutanées et seulement 2 rats en présentaient au sacrifice.

Dans le groupe de rats traités avec du gadodiamide et du DMSO, une diminution lente et moins importante du score clinique (diminution spontanée de la présence, du nombre et de la forme des lésions) a été notée (**Figure 97**). Au final, avant le début des administrations de DMSO (J36), 5 rats sur 12 présentaient des lésions cutanées et seulement 2 rats en présentaient au sacrifice (J58).

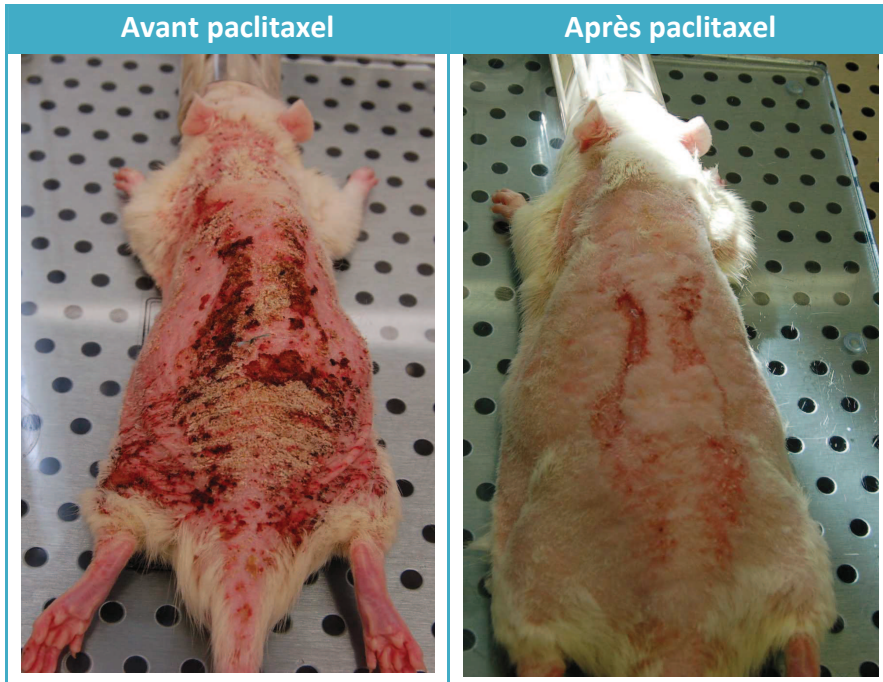


Figure 95 : Examen macroscopique du rat 27 (groupe 4, gadodiamide et paclitaxel)

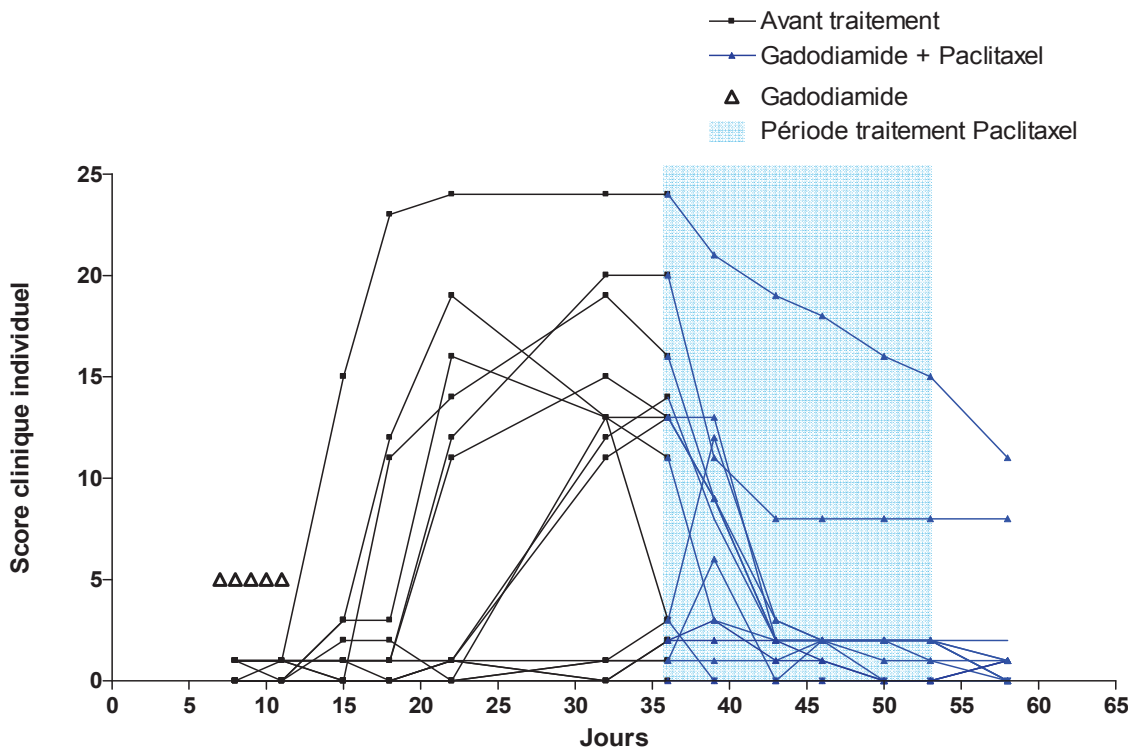


Figure 96 : Evolution du score clinique global individuel du groupe recevant du gadodiamide (J7 à J11) et du paclitaxel (J36 à J49) (groupe 4)

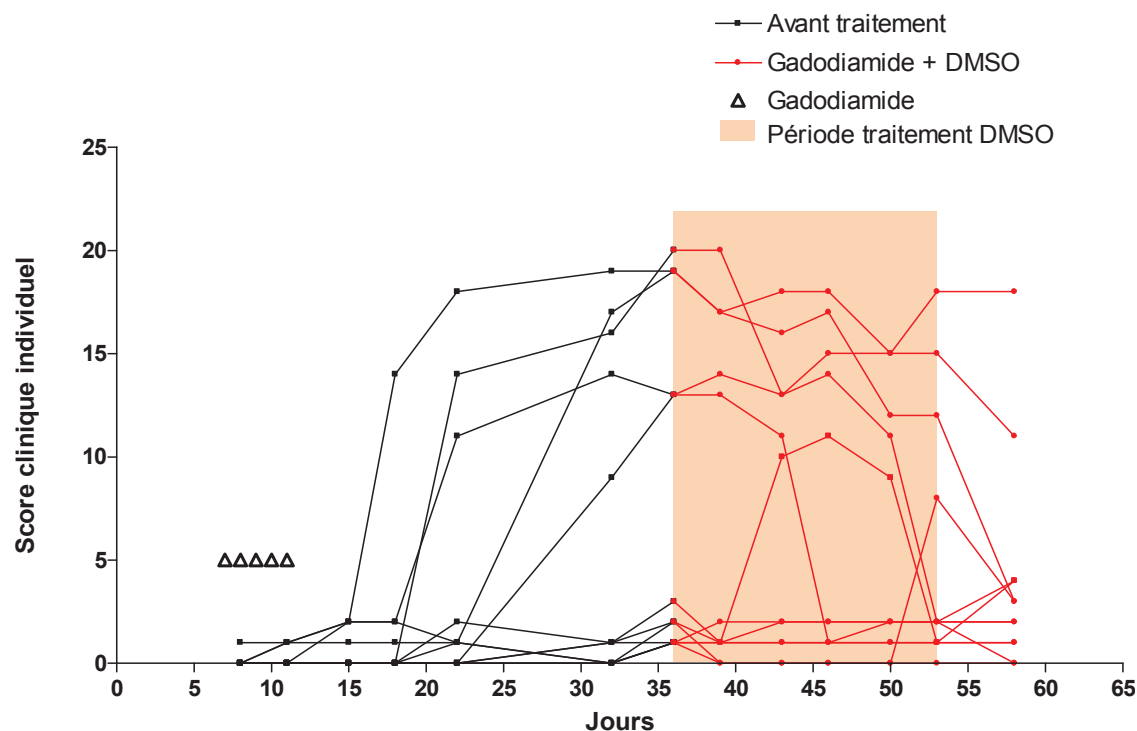


Figure 97 : Evolution du score clinique global individuel du groupe recevant du gadodiamide (J7 à J11) et du DMSO (J36 à J53) (groupe 3)

7.1.3.3 Histologie

Le **Tableau 38** ci-dessous présente les résultats des principaux paramètres histologiques (inflammation et fibrose) et immunohistochimiques (ED-1, TIMP-1, TGF β 1 et P-SMAD 3) évalués.

Dans le groupe témoin absolu (NaCl 0,9% et DMSO), un rat a présenté une lésion macroscopique due probablement à une infection d'une biopsie. Chez ce rat, une inflammation et une fibrose, associées à une augmentation des marqueurs immunohistochimiques étudiés, ont été observées dans le derme, au site de la lésion.

Avant les administrations de DMSO ou de paclitaxel (J36), seulement deux rats du groupe gadodiamide et DMSO (groupe 3) présentaient une inflammation et une fibrose du derme alors que 6 rats avaient une inflammation et 4 rats une fibrose du derme dans le groupe traité par gadodiamide et paclitaxel (groupe 4).

A J36, avant la 1^{ère} administration de paclitaxel ou de DMSO, 8 rats sur 27 ayant reçu le gadodiamide présentaient une surexpression du marqueur pro-fibrosant TGF β . Une surexpression de SMAD 3 phosphorylée a été observée chez 7 de ces 8 animaux. Des exemples de surexpression de ces deux marqueurs sont présentés dans la **Figure 100** ci-dessous.

Au sacrifice, une augmentation du nombre d'animaux présentant des foyers d'inflammation du derme a été observée chez les rats ayant reçu le gadodiamide et du DMSO (5 rats sur 12 vs. 2 rats à J36). En revanche, seulement deux rats sur 15 présentaient une inflammation chez les animaux ayant reçu le gadodiamide et le paclitaxel (vs. 6 rats à J36). Une augmentation des marqueurs immunohistochimiques (J58 vs. J36), et notamment TGFβ et P-SMAD 3, a aussi été observée chez les rats ayant reçu le gadodiamide et du DMSO alors qu'une diminution a été notée chez rats traités par le paclitaxel (**Tableau 38**) (exemple **Figure 100**).

A J36, on note une augmentation de la cellularité dans le derme chez tous les animaux recevant du le gadodiamide ($p < 0,01$ vs. J7 et vs. NaCl 0,9% à J36) (**Figure 99**). Au sacrifice, chez tous ces animaux, la cellularité est revenue à sa valeur initiale (c'est-à-dire, celle observée à J7). La cellularité du derme ne diffère pas significativement entre le groupe recevant le gadodiamide et le paclitaxel et celui recevant uniquement le gadodiamide (et le solvant DMSO) (**Figure 98**).

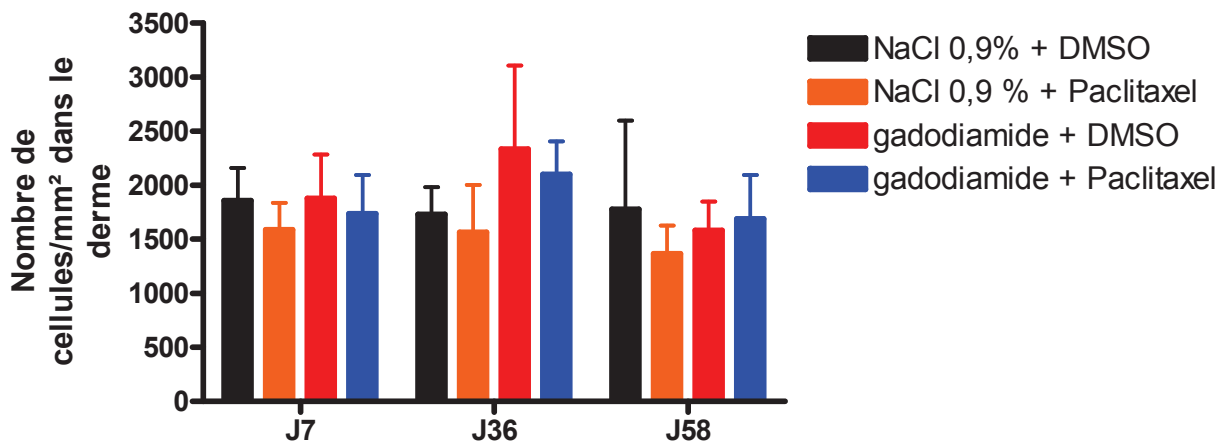


Figure 98 : Cellularité dans le derme des rats, évaluée à J7 (avant injection du NaCl 0,9% ou du gadodiamide), J36 (avant administration de DMSO ou de paclitaxel) ou J58 (sacrifice) par groupe.

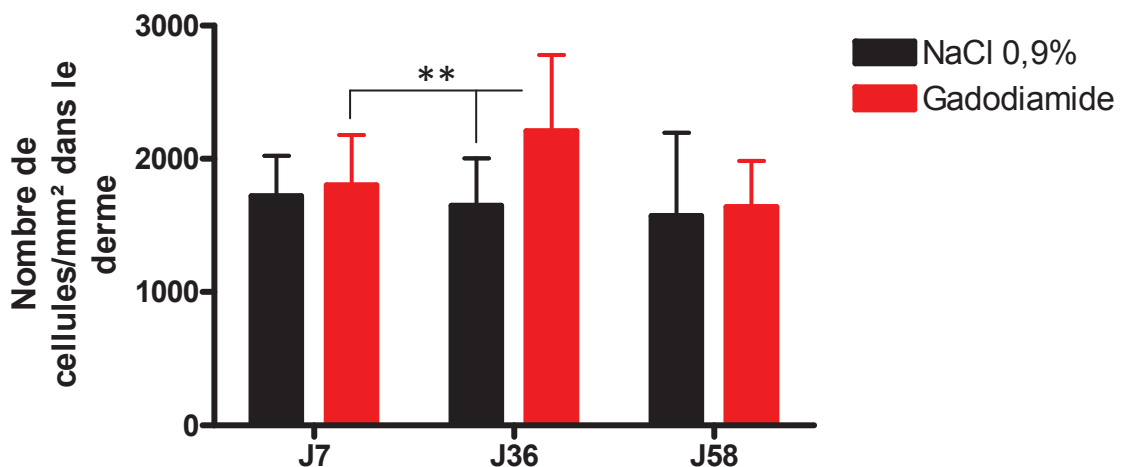


Figure 99 : Cellularité dans le derme des rats, évaluée à J7, J36 et J58. Résultats des groupes 1 et 2 regroupés (NaCl 0,9%) et des groupes 3 et 4 regroupés (gadodiamide).

Tableau 38 : Nombre d'animaux présentant des lésions cutanées macroscopiques (si supérieures à 2 lésions) et évaluation semi-quantitative des différents paramètres histologiques et immunohistochimiques de la peau dorsale avant (J36) et après (J58) les administrations de DMSO ou de paclitaxel (+ faible, ++ modéré, +++ important)

	J36 Avant paclitaxel ou DMSO							J57 Après paclitaxel ou DMSO							
	Clinique		Histologie		Immunohistochimie			Clinique		Histologie		Immunohistochimie			
	Lésions cutanées	Inflammation	Fibrose	ED-1	TIMP-1	TGFβ	P-SMAD3	Lésions cutanées	Inflammation	Fibrose	ED-1	TIMP-1	TGFβ	P-SMAD3	
NaCl 0,9% + DMSO	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8 (une lesion)	1/8 + : 1 ++ : 0 +++ : 0	1/8 + : 1 ++ : 0 +++ : 0	1/8 + : 0 ++ : 1 +++ : 0	1/8 + : 0 ++ : 1 +++ : 0	1/8 + : 0 ++ : 1 +++ : 0	1/8 + : 1 ++ : 0 +++ : 0	
NaCl 0,9% + paclitaxel	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	
Gadodiamide + DMSO	5/12 + : 1 ++ : 0 +++ : 1	2/12 + : 1 ++ : 1 +++ : 0	2/12 + : 1 ++ : 1 +++ : 0	4/12 + : 2 ++ : 0 +++ : 2	3/12 + : 2 ++ : 0 +++ : 1	2/12 + : 0 ++ : 1 +++ : 1	2/12 + : 1 ++ : 1 +++ : 0	2/12	5/12 + : 3 ++ : 2 +++ : 0	1/12 + : 0 ++ : 0 +++ : 1	6/12 + : 2 ++ : 2 +++ : 2	5/12 + : 4 ++ : 1 +++ : 0	5/12 + : 3 ++ : 1 +++ : 1	4/12 + : 2 ++ : 2 +++ : 0	4/12 + : 2 ++ : 2 +++ : 0
Gadodiamide + paclitaxel	7/15 + : 2 ++ : 2 +++ : 2	6/15 + : 2 ++ : 2 +++ : 0	4/12 + : 2 ++ : 2 +++ : 0	8/15 + : 4 ++ : 1 +++ : 3	7/15 + : 6 ++ : 1 +++ : 0	6/15 + : 1 ++ : 5 +++ : 0	5/15 + : 3 ++ : 0 +++ : 2	2/15	2/15 + : 0 ++ : 1 +++ : 1	1/15 + : 0 ++ : 1 +++ : 0	4/15 + : 2 ++ : 0 +++ : 2	4/15 + : 2 ++ : 0 +++ : 2	2/15 + : 0 ++ : 1 +++ : 1	2/15 + : 0 ++ : 1 +++ : 1	

Groupe	J36		J58	
	TGFβ	P-SMAD 3	TGFβ	P-SMAD 3
NaCl 0,9% DMSO (rat 4)				
NaCl 0,9% Paclitaxel (rat 14)				
Gadodiamide DMSO (rat 36)				
Gadodiamide Paclitaxel (rat 19)				

Figure 100 : Immunohistochimie de la peau dorsale à J36 (avant traitement paclitaxel ou DMSO) et J58 (sacrifice) avec un anticorps anti-TGFβ et un anticorps anti-P-SMAD 3

7.1.3.4 Hématologie

Une légère neutropénie (**Figure 101**) est observée après traitement par le paclitaxel chez les animaux témoins (groupe 2) ($p < 0,05$ à J58 vs. J36).

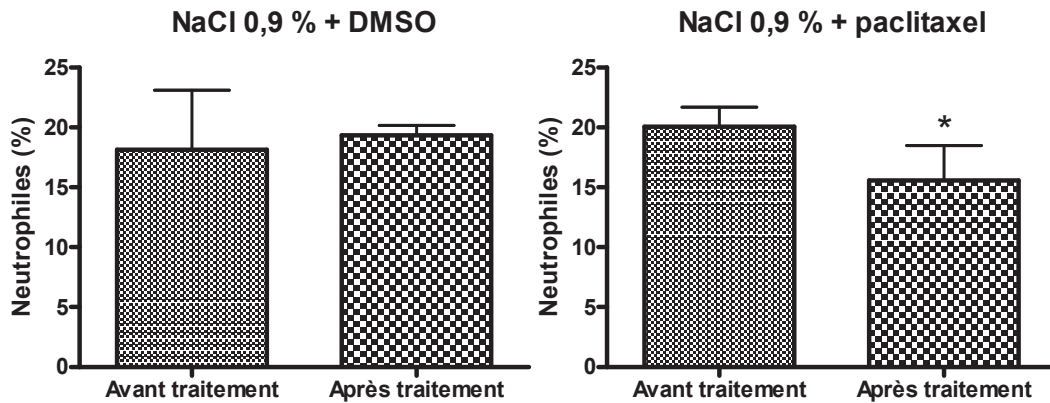


Figure 101 : Pourcentage de neutrophiles dans le sang, évalué avant (J36) et après traitement (J58) au DMSO ou paclitaxel ($p < 0,05$ (*))

7.1.3.5 Créatinine plasmatique

La concentration plasmatique de créatinine est plus élevée à la fin du régime enrichi en adénine, pour tous les groupes par rapport à la valeur initiale à J0, avant le début du régime enrichi en adénine (**Figure 102**). La créatininémie a diminué dès l'arrêt de l'adénine. Néanmoins, les créatininémies moyennes mesurées après l'arrêt du régime à l'adénine ne diffèrent pas significativement de celles mesurées à ce délai, la variabilité étant importante.

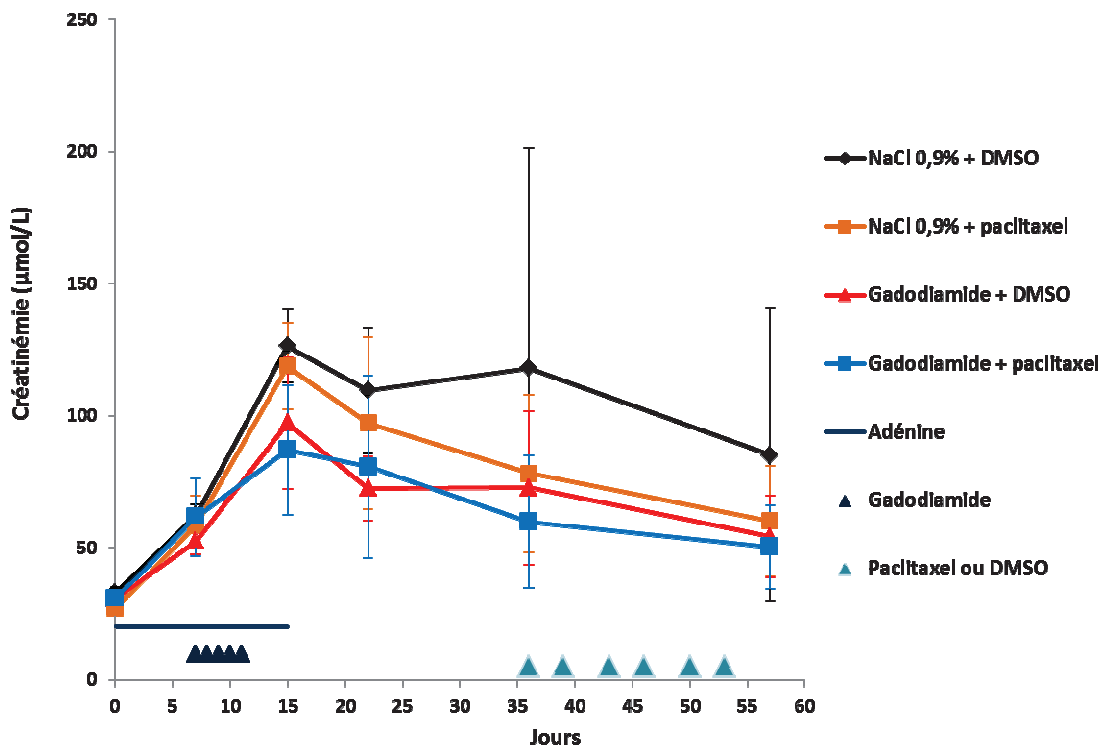


Figure 102 : Evolution de la créatinine plasmatique en fonction des traitements

7.1.3.6 Concentration de Gd total tissulaire

- **Peau**

La concentration de gadolinium total mesurée dans la peau dorsale ne diffère pas significativement entre les rats ayant reçu le gadodiamide et le paclitaxel et ceux ayant reçu uniquement le gadodiamide (**Figure 103**). Entre les deux délais de mesure (avant traitement curatif et au sacrifice), la concentration de Gd total dans la peau est restée stable.

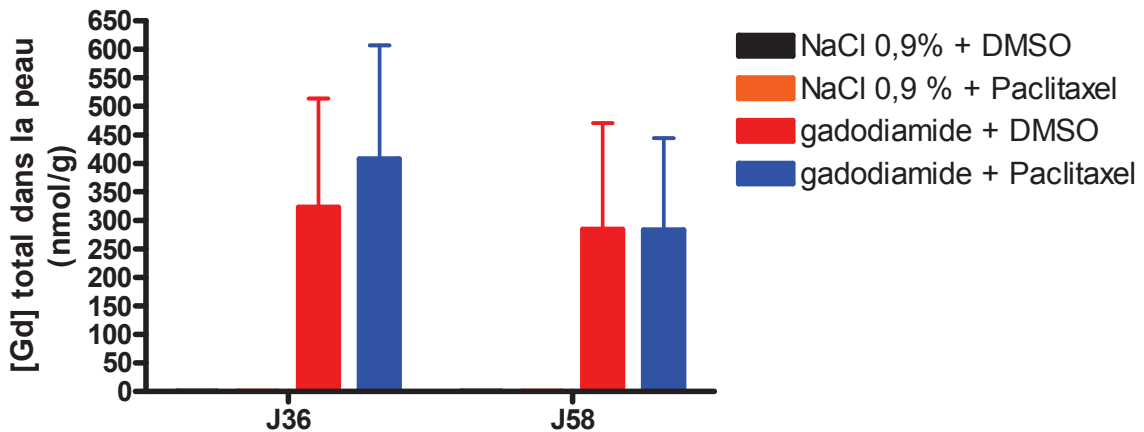


Figure 103 : Concentration de Gd total dans la peau dorsale à J36 (avant administration de DMSO ou de paclitaxel) et J58 (sacrifice)

- **Autres tissus**

Dans les autres tissus, aucune différence, entre la concentration de Gd total mesurée dans les tissus des rats ayant reçu le gadodiamide et le paclitaxel et celle mesurée chez les rats ayant reçu le gadodiamide et le DMSO, n'a été observée (**Figure 104**). La rétention de Gd total était très importante dans le rein, importante dans la peau et le fémur et plus faible dans le foie et la rate.

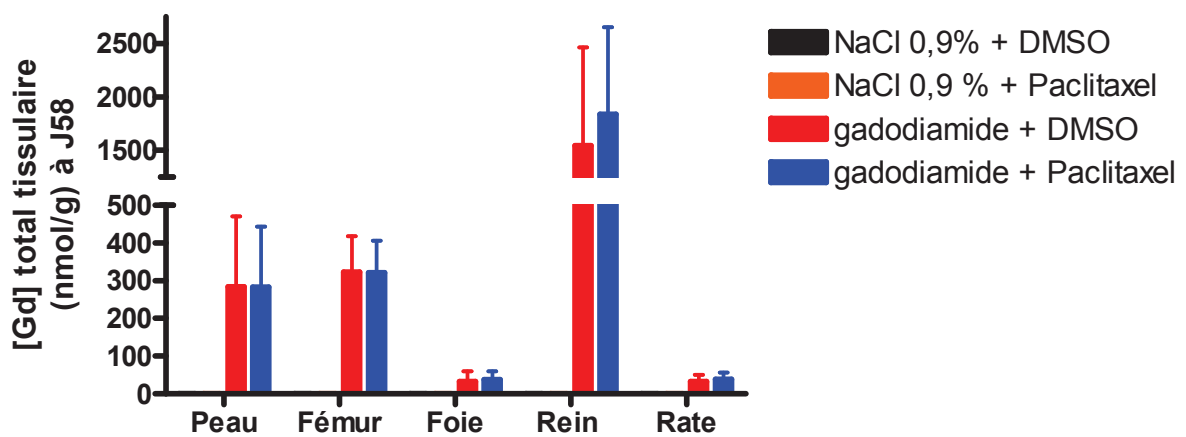


Figure 104 : Concentration de Gd total tissulaire à J58 (sacrifice)

7.2 Approche pharmacologique de la signalisation impliquée dans les effets du gadodiamide sur un modèle d'insuffisance rénale chronique (partie 2)

7.2.1 Introduction

Dans une première partie, nous avons montré que le **paclitaxel réduit fortement et rapidement les lésions macroscopiques et histologiques** chez les rats ayant reçu le gadodiamide. Néanmoins, peu d'animaux ont présenté des lésions à la fois macroscopiques et microscopiques et les lésions ne sont pas apparues aux mêmes délais (**variabilité inter-individuelle très importante**). De plus, les lésions macroscopiques ont régressé spontanément chez certains animaux n'ayant pas reçu le paclitaxel (gadodiamide et DMSO), même si la disparition des lésions a été plus rapide avec le paclitaxel. Par ailleurs, nous avons observé une **amélioration de la fonction rénale** dès l'arrêt du régime enrichi en adénine, ce qui n'est pas cohérent avec la clinique.

Le **degré de l'insuffisance rénale** et sa **réversibilité** sont des paramètres importants qui influent sur le degré d'intensité des lésions et leur délai d'apparition. Par conséquent, nous avons réalisé une seconde étude (voir section 6.3.2 Modèle d'insuffisance rénale sévère et stable) afin d'obtenir un modèle cliniquement pertinent de FSN, associé à une variabilité inter-individuelle plus faible et une réponse la plus homogène possible aux plans chronologique et de l'intensité des effets cliniques.

Les animaux ont ainsi reçu une alimentation enrichie en adénine pendant une semaine supplémentaire après la fin des injections de gadodiamide, soit au total pendant **3 semaines** (J0 à J21, contre 2 semaines dans l'étude précédente) afin d'induire une **insuffisance rénale sévère et stable**.

Ce protocole a permis d'obtenir un modèle présentant une plus faible variabilité inter-individuelle dans la survenue et l'intensité des lésions cutanées. Dix jours après la dernière injection de gadodiamide (fin du régime enrichi en adénine), 8 rats sur 12 rats présentaient des lésions macroscopiques, qui ont persisté jusqu'à la fin de l'étude.

Nous avons testé l'interaction de la même faible dose de paclitaxel avec les effets profibrosants du gadodiamide (Omniscan[®]) sur ce nouveau modèle.

7.2.2 Matériels et méthodes

- **Animaux**

L'expérimentation a été réalisée chez 32 rats mâles Wistar (CERJ) de 6 semaines (poids 200-220g). Les animaux sont strictement similaires à nos études précédentes.

- **Produits testés:**

L'étude a compris 4 groupes (**Tableau 39**).

Tableau 39 : Groupes et produits injectés

Groupe	Produits	Nom commercial	Fournisseur	Concentration	Dose	Volume injecté	N
1	NaCl	-	Lavoisier	9 g/L	-	5 mL/kg	6
	DMSO	-	Sigma	-	-	0,6 mL mL/kg	
2	NaCl	-	-	9 g/L	-	5 mL/kg	6
	Paclitaxel	-	VWR	0,5 mg/mL	0,3 mg/kg	0,6 mL mL/kg	
3	Gadodiamide	Omniscan®	GE	500 mM	2,5 mmol/kg	5 mL/kg	10
	DMSO	-	Sigma	-	-	0,6 mL mL/kg	
4	Gadodiamide	Omniscan®	GE	500 mM	2,5 mmol/kg	5 mL/kg	10
	Paclitaxel	-	VWR	0,5 mg/mL	0,3 mg/kg	0,6 mL mL/kg	

• Réalisation de l'expérimentation

Le synoptique de l'étude apparaît dans la **Figure 105** ci-dessous :

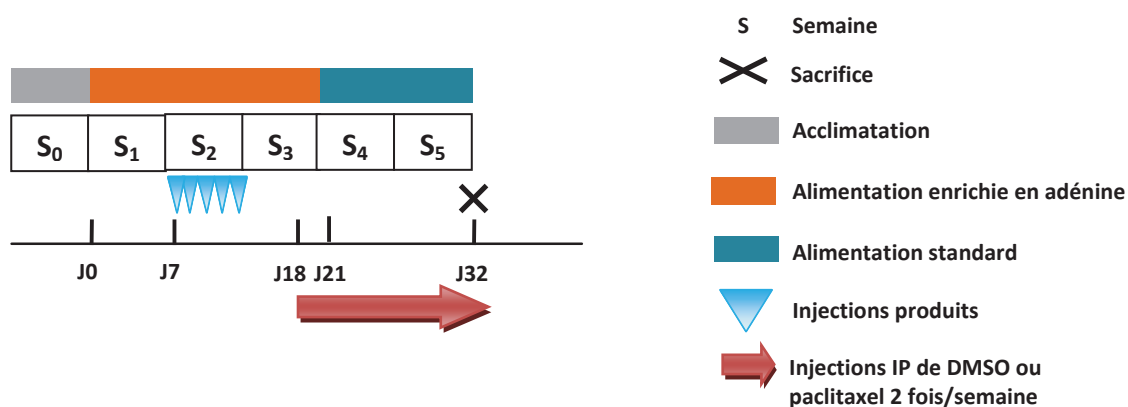


Figure 105 : Synoptique de l'étude

Tous les animaux ont été rendus insuffisants rénaux par ajout d'adénine dans l'alimentation (0,75%) pendant trois semaines (J0 à J21).

Le gadodiamide ou le NaCl 0,9% (témoin) sont injectés par voie IV dans la veine caudale, avec un système Insys® et de perfusion à 1 mL/mn, durant la 2^e semaine du régime enrichi en adénine (J7 à J11). Les administrations par voie intrapéritonéale de paclitaxel ou de DMSO (solvant du paclitaxel, témoin) sont effectuées de J18 à J28 à raison de deux fois par semaine. Les animaux ont été euthanasiés à J32 par exsanguination au niveau de l'aorte abdominale sous anesthésie générale.

Cette étude a été effectuée en 2 séries de 16 animaux.

• Paramètres étudiés

Un **examen clinique** a été réalisé quotidiennement (**Tableau 34**).

La mesure du **score clinique** a été réalisée deux fois par semaine.

Les **paramètres mesurés** lors de cette étude apparaissent dans le **Tableau 40** :

- Numération Formule Sanguine (Automate MS4-S, Melet-Schloesing, Osny)

- Mesure de la créatinine plasmatique (Vitros Fusion 5.1 ; Laboratoire d'Analyses Médicales Diai, Sevrans)
- Dosage du Gd total dans la peau (SM ; Service de Bioanalyse, Guerbet)
- Histologie de la peau (réalisée par le Pr. Bruneval, HEGP) :
 - o Une coloration HES est effectuée afin de rechercher la présence éventuelle d'une inflammation et/ou d'une fibrose.
 - o Immunohistochimie : TGFβ1 (marqueur pro-fibrosant).
 - o Immunohistochimie : CTGF et PDGF (deux marqueurs impliqués dans la fibrose) (uniquement groupes 1 et 3).
 - o Suite à la description histologique effectuée par le Pr. Bruneval, nous avons évalué les données selon une échelle semi-quantitative (+ : faible ou rare ; ++ : modéré ; +++ : nombreux, sévère ou important).

Tableau 40 : Paramètres étudiés lors de l'étude

	Sem 1		Sem 2					Sem 3					Sem 4					Sem 5				
	J0	J4	J7	J8	J9	J10	J11	J14	J15	J16	J17	J18	J21	J22	J23	J24	J25	J28	J29	J30	J32	J32
Adénine	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*										
NaCl 0,9% ou gadodiamide IV			*	*	*	*	*															
DMSO ou paclitaxel IP											*		*			*		*				
Suivi clinique	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Score clinique				*					*		*		*		*		*		*		*	
Poids corporel	*	*	*	*	*	*	*		*		*		*		*		*		*		*	
Créatinine plasmatique	*	*	*								*		*		*						*	
Gd total peau			*								*											*
Histologie peau (HES)			*								*											*
Immunohistochimie peau (TGFβ)											*											*
Immunohistochimie peau (CTGF et PDGF) (uniquement groupes 1 et 3)																						*

• **Analyse statistique**

Les données sont présentées (lorsque n > 2) avec leur écart-type. L'analyse statistique a été réalisée en fonction des paramètres mesurés. Une analyse de la variance à mesures répétées à deux facteurs (interaction traitement x délai) a été choisie afin d'étudier l'évolution pondérale, les paramètres biochimiques et hématologiques. Nous avons comparé l'effet produit sur la concentration en gadolinium total dans la peau au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur (produit). Une différence est considérée comme significative

à un risque alpha < 0.05 (*). Le logiciel utilisé a été Graph Pad Prism® (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

7.2.3 Résultats

7.2.3.1 Evolution pondérale

Une diminution du poids corporel contemporaine au régime enrichi en adénine a été notée. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes.

7.2.3.2 Créatinine plasmatique

La créatininémie a augmenté dès J4 ($p < 0,01$ vs. J0) jusqu'à J25 où elle est restée stable pour tous les groupes; $p < 0,001$ vs. J0) (**Figure 106**). L'administration de 3 semaines de régime enrichi en adénine (étude 2), contre 2 semaines dans l'étude précédente (étude 1), induit une augmentation de la créatininémie deux fois plus importante (à l'arrêt du régime en adénine : $207,3 \pm 42,7 \mu\text{mol/L}$ versus $98,0 \pm 26,3 \mu\text{mol/L}$) (étude 1 **Figure 79** ; étude 2 **Figure 106**).

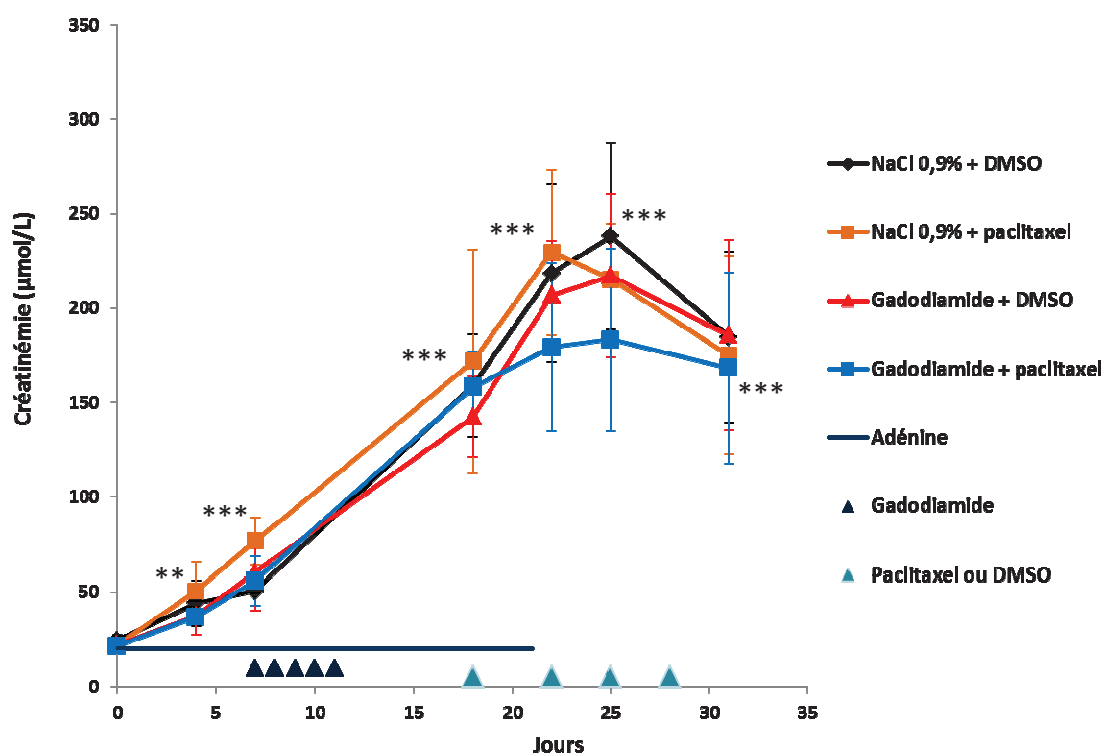


Figure 106 : Evolution de la créatinine plasmatique en fonction des traitements ($p < 0,01$ (**) vs. J0 et $p < 0,001$ (***) vs. J0) (étude 2)

7.2.3.3 Score clinique

Un rat est mort lors de l'anesthésie à J10 (groupe 3) et un rat a été euthanasié à J11 (groupe 4) à cause d'une chute de poids trop importante. Ces deux animaux ont donc été sortis de l'étude.

Aucune lésion cutanée macroscopique et aucun signe clinique n'ont été observés chez les animaux des groupes témoins (groupes 1 et 2), excepté une piloérection et un poil terne dus au régime enrichi en adénine.

L'évolution du score clinique des rats ayant reçu le gadodiamide est présentée dans la **Figure 107** et la **Figure 108** ci-dessous.

Après administration de gadodiamide, une élévation importante du score clinique, liée à l'apparition de lésions macroscopiques cutanées, est mise en évidence chez 8 rats sur 16 à J18. Le paclitaxel n'induit pas d'amélioration du score clinique. En effet, ils restent stables jusqu'au sacrifice (**Figure 107**), comme chez les rats du groupe témoin 3 (gadodiamide + DMSO) (**Figure 108**).

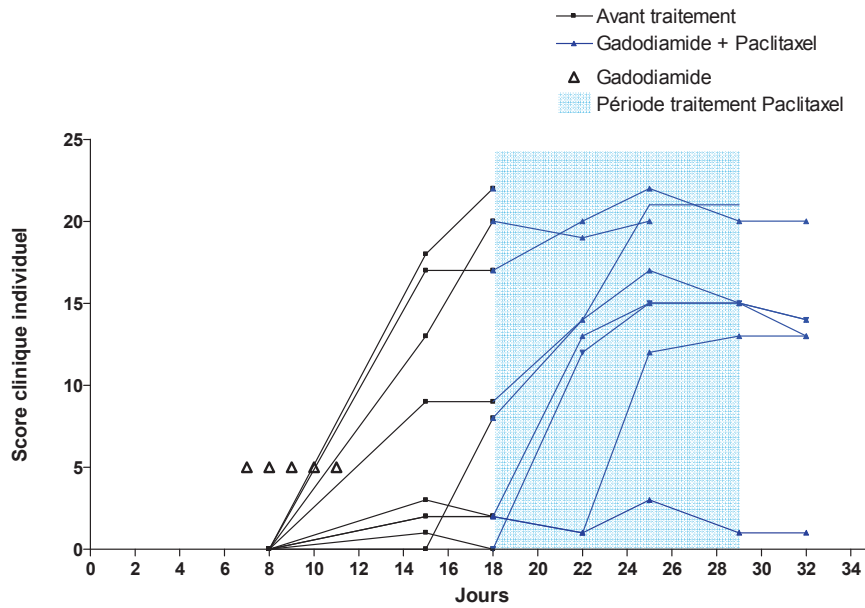


Figure 107 : Evolution du score clinique global individuel des rats ayant reçu du gadodiamide et du paclitaxel (groupe 4)

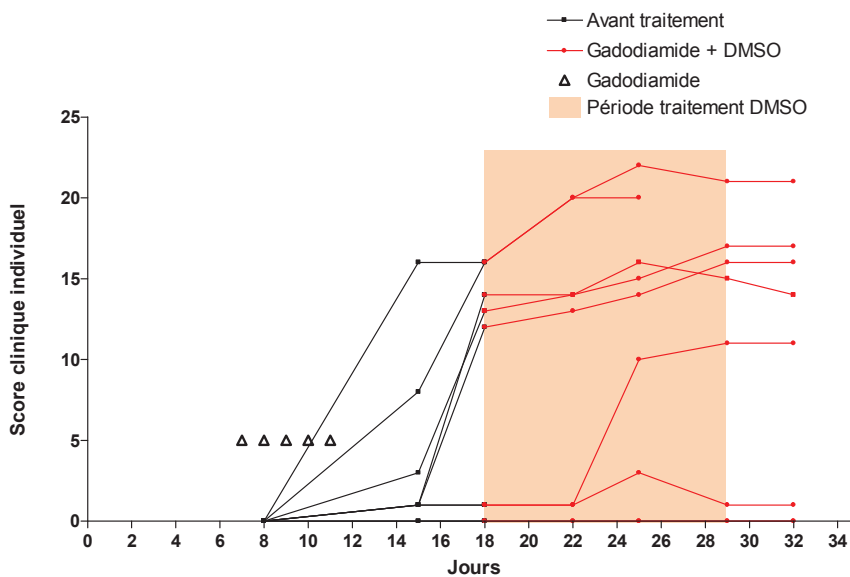


Figure 108 : Evolution du score clinique global individuel des rats ayant reçu du gadodiamide et du DMSO (groupe 3)

Quatre rats (un dans le groupe 3 et trois dans le groupe 4) ont été euthanasiés avant la fin de l'étude pour raisons éthiques car ils avaient atteint les points limites de l'étude (lésions cutanées très étendues et signes de prostration, activité nulle ou faible, perte de poids importante).

Chez les animaux ayant reçu du gadodiamide (groupes 3 et 4), la créatinémie est corrélée au score clinique avant la première injection de paclitaxel ou de DMSO (**Figure 109**).

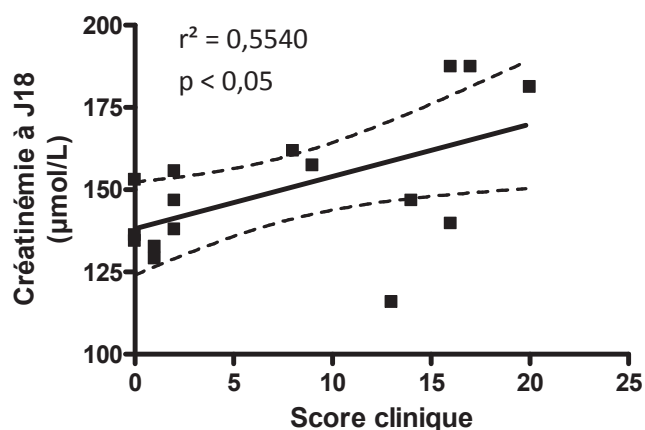


Figure 109 : Corrélation positive entre la concentration de créatinine plasmatique et le score clinique à J18 (1^{er} jour des administrations de paclitaxel ou de DMSO) chez les rats ayant reçu du gadodiamide

7.2.3.4 Histologie

Les résultats histologiques et immunohistochimiques sont résumés dans le **Tableau 41** ci-dessous.

Dans le groupe témoin absolu, un foyer inflammatoire TGFβ positif a été observé dans le derme d'un rat.

Avant les administrations de DMSO ou de paclitaxel (J18), 5 sur 9 rats du groupe gadodiamide et DMSO (groupe 3) présentaient une inflammation et 3 sur 9 présentaient une fibrose du derme. Chez le groupe 4 (gadodiamide + paclitaxel), 6 rats sur 9 avaient une inflammation et 5 rats une fibrose. Le TGFβ était surexprimé dans la peau des rats ayant reçu le gadodiamide (12 rats sur 18) à J18.

A la fin des traitements (c'est-à-dire au sacrifice, J32), aucune amélioration de l'inflammation et de la fibrose n'est observée chez les animaux ayant reçu du gadodiamide et du DMSO ou du paclitaxel. La surexpression de TGFβ est comparable à celle observée à J18 (**Tableau 41**). Des exemples de coupes histologiques et d'immunohistochimie sont présentés dans la **Figure 110**.

Par ailleurs, nous avons étudié par immunohistochimie l'implication de deux autres marqueurs impliqués dans les fibroses : CTGF et PDGF. Ainsi, nous avons recherché

l'expression de ces deux marqueurs uniquement dans le groupe témoin absolu (groupe 1 : NaCl 0,9% + DMSO) et le groupe témoin gadodiamide (groupe 3 : gadodiamide + DMSO). Le CTGF et le PDGF sont apparus surexprimés (avec la même intensité) dans la peau de 6 rats sur 8 ayant reçu du gadodiamide. Dans la peau de ces 6 rats, la surexpression de TGF β a également été notée (**Tableau 41**). Des exemples d'images d'immunohistochimie comparées (les 3 marqueurs sur un même rat) apparaissent dans la **Figure 111**.

Tableau 41 : Nombre d'animaux présentant des lésions cutanées macroscopiques (si supérieures à 2 lésions) et évaluation semi-quantitative des différents paramètres histologiques et immunohistochimiques de la peau dorsale avant (J18), pendant (J25) et après (J32) les administrations de DMSO ou de Paclitaxel (+ faible, ++ modéré, +++ important)

	J18 Avant paclitaxel ou DMSO					J25 Pendant paclitaxel ou DMSO			J32 Après paclitaxel ou DMSO						
	Clinique Lésions cutanées	Histologie		Immunohistochimie		Clinique Lésions cutanées	Histologie		Clinique Lésions cutanées	Histologie		Immunohistochimie			
		Inflammation	Fibrose	TGFβ	Inflammation		Fibrose	Inflammation		Fibrose	TGFβ	CTGF	PDGF		
NaCl 0,9% + DMSO	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6 (dans le foyer inflammatoire)	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
NaCl 0,9% + paclitaxel	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	N/D	N/D
Gadodiamide + DMSO	5/9 ++:1 ++:1 +++ :3	5/9 ++:1 ++:1 +++ :3	3/9 +:0 ++:0 +++ :3	6/9 +:2 ++:1 +++ :3	6/9 +:2 ++:2 +++ :2	6/9 +:2 ++:0 +++ :3	6/9 +:2 ++:0 +++ :3	6/9 +:2 ++:1 +++ :4	5/8 +:2 ++:1 +++ :4	3/8 +:0 ++:0 +++ :3	6/8 +:0 ++:3 +++ :3	6/8 +:1 ++:2 +++ :3	6/8 +:1 ++:2 +++ :3	6/8 +:1 ++:2 +++ :3	6/8 +:1 ++:2 +++ :3
Gadodiamide + paclitaxel	6/9 ++:1 ++:1 +++ :4	6/9 ++:1 ++:0 +++ :5	5/9 +:0 ++:0 +++ :5	6/9 +:1 ++:0 +++ :5	7/8 +:0 ++:2 +++ :4	6/8 +:0 ++:0 +++ :6	6/8 +:0 ++:2 +++ :4	5/6 +:0 ++:5 +++ :0	5/6 +:0 ++:5 +++ :0	5/6 +:1 ++:0 +++ :4	5/6 +:0 ++:3 +++ :2	5/6 +:1 ++:0 +++ :4	5/6 +:0 ++:3 +++ :2	5/6 +:1 ++:0 +++ :4	5/6 +:0 ++:5 +++ :0

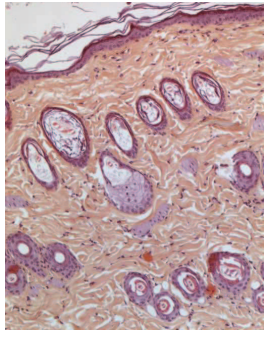
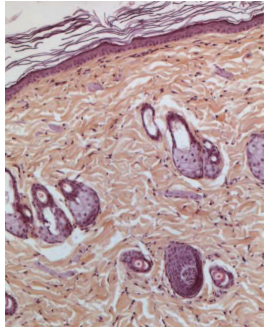
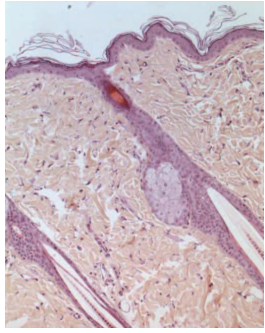
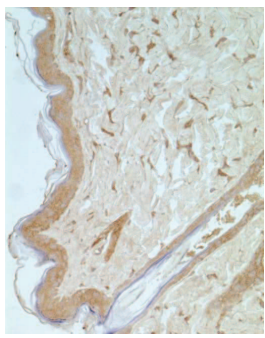
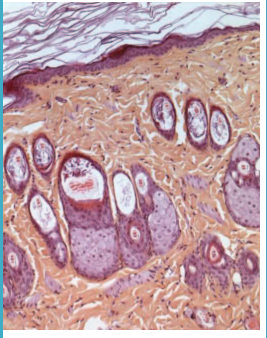

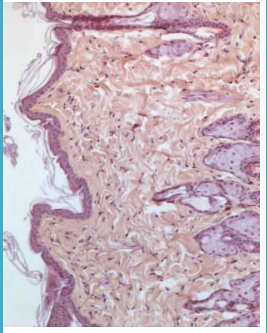
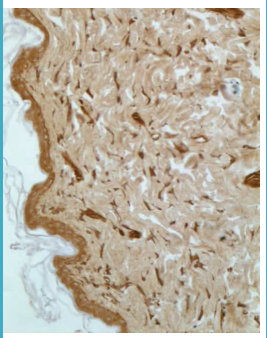
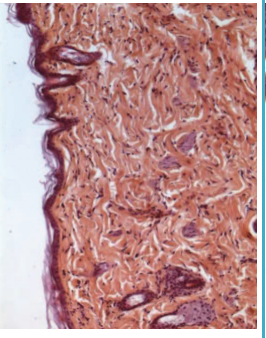
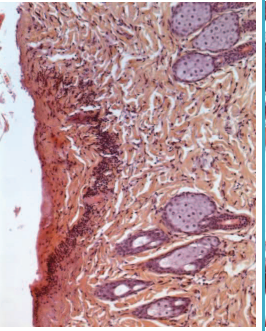
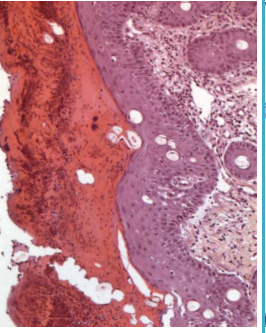
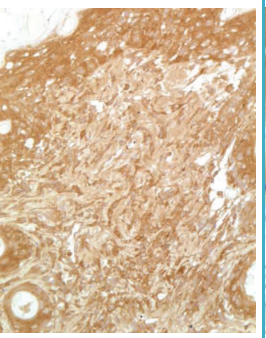
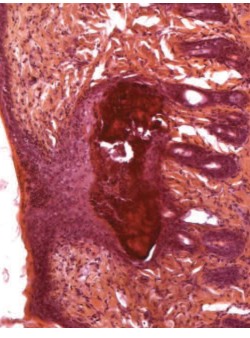
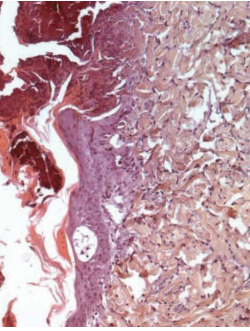
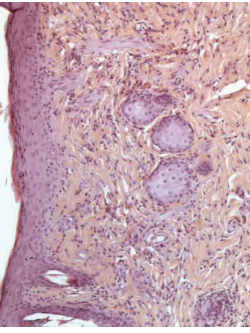
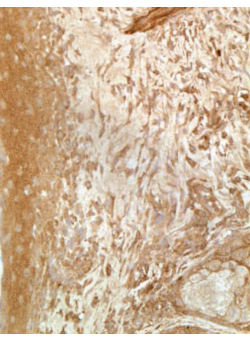
Groupes	J18 HES	J25 HES	J32 HES	J32 TGFβ
NaCl 0,9% DMSO (rat 2)				
NaCl 0,9% Paclitaxel (rat 10)				
Gadodiamide DMSO (rat 26)				
Gadodiamide Paclitaxel (rat 31)				

Figure 110 : Coupes histologiques (coloration HES ; x10) et immunohistochimie (anti-TGFβ ; x20) de la peau dorsale à J18 (avant traitement paclitaxel ou DMSO) et à J32 (sacrifice)

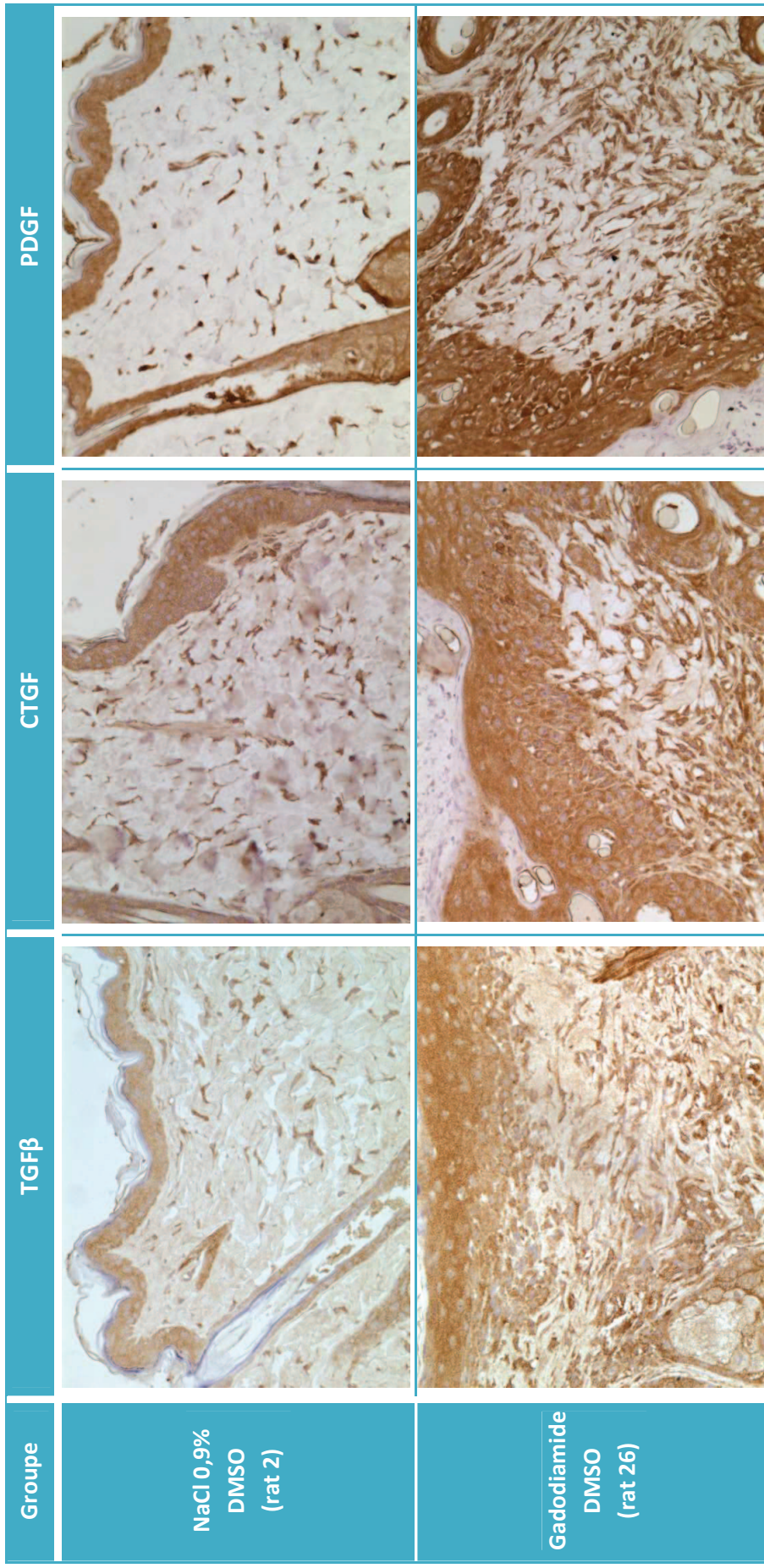


Figure 111 : Immunohistochimie (anti-TGFB β , anti-CTGF, anti-PDGF ; x20) de la peau dorsale à J32 (sacrifice) dans les groupes 1 et 3.

7.2.3.5 Concentration de Gd total dans la peau

Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe 3 (gadodiamide + DMSO) et le groupe 4 (gadodiamide + paclitaxel) en ce qui concerne les concentrations de Gd total mesuré dans la peau dorsale (**Figure 112**).

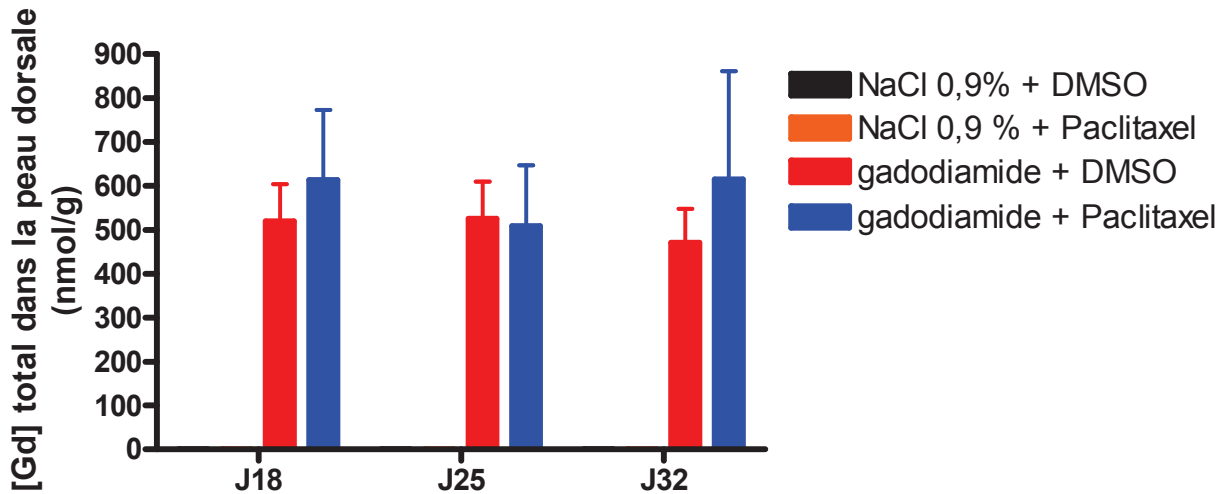


Figure 112 : Concentration de Gd total dans la peau dorsale

Néanmoins, à J18 (avant la 1^{ère} administration de paclitaxel ou de DMSO), la concentration de Gd total est corrélée à la concentration de créatinine plasmatique ($r^2 = 0,6978$; $p < 0,01$) (**Figure 113**) et au score clinique ($r^2 = 0,6734$; $p < 0,01$) (**Figure 114**).

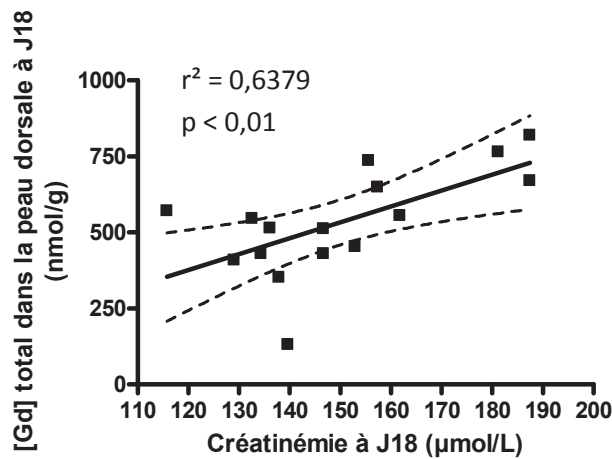


Figure 113 : Corrélation positive entre la concentration de Gd total dans la peau et la créatinémie à J18

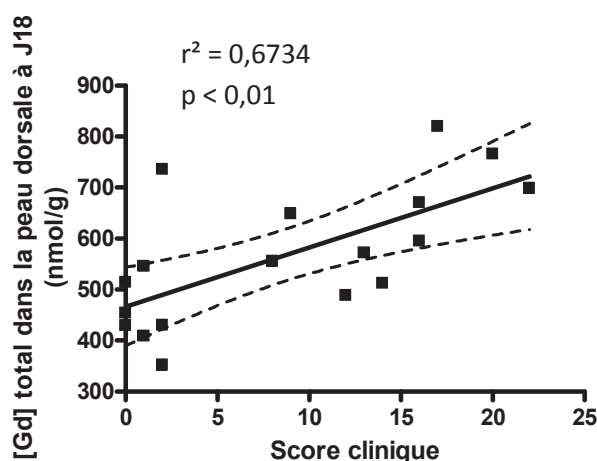


Figure 114 : Corrélation positive entre la concentration de Gd total dans la peau et le score clinique à J18

7.3 Conclusion

Dans un premier temps, nous avons étudié l'implication de la voie de TGF β dans les effets pro-fibrosants du gadodiamide sur un modèle d'insuffisance rénale **modérée**. Nous avons choisi une approche pharmacologique, en utilisant le **paclitaxel**, qui présente des propriétés inhibitrices de la voie de **signalisation du TGF β SMAD-dépendante** (Liu et coll., 2005 ; Zhang et coll., 2010) à faibles doses.

Après administration de **gadodiamide**, des **lésions cutanées macroscopiques** sont apparues chez 14 rats sur 27. Des lésions **histologiques** sont également observées : une fibrose du derme, mais principalement de l'inflammation (présence de macrophages ED-1+). Le modèle expérimental est également associé à la **surexpression** du marqueur pro-fibrosant **TGF β** et de **P-SMAD-3**, qui est impliqué dans la voie de signalisation canonique de ce dernier.

Nos données montrent que le **paclitaxel diminue fortement et rapidement** (dès la 1^{ère} semaine) les **lésions macroscopiques** épidermiques et les lésions **histologiques** (diminution de l'inflammation et de la fibrose du derme, de l'expression de TGF β et P-SMAD-3) chez les rats ayant reçu le gadodiamide. Néanmoins, nous ne pouvons pas conclure en ce qui concerne la **numération cellulaire** dans le derme car nous avons probablement évalué ce paramètre à un délai trop tardif, qui n'est plus discriminant. De plus, **peu d'animaux** ont présenté des lésions à la fois macroscopiques et microscopiques, les lésions ne sont **pas apparues aux mêmes délais** et avec une **intensité variable** (variabilité inter-individuelle très importante). Enfin, nous avons observé une **amélioration de la fonction rénale** après l'arrêt du régime enrichi à l'adénine.

Par conséquent, nous avons ensuite testé le paclitaxel sur un **modèle plus sensibilisé** (ajout d'une semaine de nourriture enrichie en adénine pour obtenir une **insuffisance rénale sévère et stable**). Ce protocole a réduit la **variabilité inter-individuelle dans la survenue et l'intensité des lésions cutanées**. Cependant, sur ce nouveau modèle, le paclitaxel **n'a pas**

présenté d'effet thérapeutique. En effet, nous n'avons observé aucune amélioration des lésions cutanées macroscopiques et histologiques.

Par ailleurs, nous avons étudié l'implication de deux autres cytokines, impliquées dans les fibroses, **CTGF et PDGF**, sur ce nouveau modèle d'insuffisance rénale sévère et stable. Nous avons observé une **surexpression** de ces deux marqueurs ainsi que du **TGF β** chez les mêmes rats traités par le gadodiamide.

Ces différents résultats seront discutés dans le chapitre « Discussion générale » de la thèse.

DISCUSSION GENERALE

Les techniques d'imagerie médicale ont permis une amélioration considérable du diagnostic de nombreuses maladies de manière non invasive et, une meilleure compréhension de la fonction de différents organes. La révolution médicale qu'elle a engendrée a commencé avec la découverte des rayons X en 1895 par Wilhelm Röntgen. Depuis une trentaine d'années, elle est le fruit d'une autre révolution, la « révolution numérique », des progrès de la physique, de la chimie et de ceux de la pharmacologie, qui ont notamment permis le développement d'agents de contraste. L'utilisation de ces molécules permet d'améliorer le contraste et sensibilise ainsi la détection des lésions. Ils permettent aussi de mieux comprendre les fonctions physiologiques (IRM fonctionnelle). Par ailleurs, l'imagerie moléculaire, nécessitant généralement l'administration de produit de contraste, est une technologie émergente qui permet l'examen de processus biologiques ayant lieu à l'échelle cellulaire ou moléculaire. L'objectif de cette approche est bien sûr d'améliorer le diagnostic mais aussi de proposer des traitements personnalisés et ciblés afin d'améliorer la prise en charge des patients.

La découverte du lien de causalité entre les complexes de gadolinium et la FSN (Grobner, 2006) a bouleversé le monde de la Radiologie. En effet, les CGs bénéficiaient jusque-là d'une excellente réputation quant à leur tolérance. Il a même été suggéré qu'il s'agissait d'une des classes de médicaments les plus sûres jamais développées (Caravan, 1999). Cependant, la FSN a rapidement été associée à l'administration d'une certaine catégorie de CGs, les CGs thermodynamiquement moins stables.

A ce jour, la **physiopathologie exacte** de cette maladie reste **obscur** malgré différents travaux de recherche *in vitro* et *in vivo*. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe **3 grandes hypothèses mécanistiques** dans la littérature (voir section 3.10 Hypothèses mécanistiques).

La première hypothèse suggère un effet associé au **complexe de gadolinium lui-même**, donc sans qu'intervienne la dissociation du complexe. Cette hypothèse est basée sur des études *in vitro* où un effet immédiat a été observé sur des cellules en culture (activation de la voie NFκB par l'intermédiaire des TLRs notamment) après ajout de gadodiamide (Wermuth et coll. 2009 et 2012). Ils proposent que la molécule de gadodiamide elle-même soit captée par les macrophages qui libèreraient ainsi des cytokines pro-inflammatoires et profibrosantes. Cependant, les concentrations testées sont parfois importantes (jusqu'à 50 mM) et nous paraissent excessives par rapport aux données de pharmacocinétique des CGs. De plus, la voie NFκB activée après cinq minutes d'exposition au gadodiamide est ubiquitaire, n'est pas spécifique de la fibrose et peut être activée lors d'un stress par exemple (Luqman et Pezzuto, 2010). Enfin, nous avons montré qu'une dissociation rapide du gadodiamide (dès la 1^{ère} heure) peut survenir dans un milieu biologique.

La seconde hypothèse suggère un effet lié à l'**excès de ligand** polyamino-polycarboxylique, ajouté dans les solutions pharmaceutiques des agents peu stables. Il serait ainsi susceptible d'inhiber des enzymes collagénolytiques (Perone et coll., 2010). Aucune étude n'a démontré cette hypothèse.

La dernière hypothèse concerne les **effets profibrosants du Gd³⁺ libéré** consécutifs à la dissociation *in vivo* des CGs les moins stables. Celle-ci est la plus largement citée dans la littérature (Frenzel et coll., 2008 ; Morcos, 2007 ; Perazella, 2008). Néanmoins, elle est également controversée par certains auteurs qui soutiennent la première hypothèse (Kuo, 2008 ; Newton et Jiménez, 2009). Ils indiquent aussi que, lorsque la stabilité des CGs est évaluée à pH physiologique dans du sérum humain (Frenzel et coll., 2008), il existe un chevauchement entre la stabilité apparente des CGs linéaires ioniques et macrocycliques. Ainsi, selon eux, le comportement de l'acide gadopentétique est similaire à celui des CGs macrocycliques, acide gadotérique et gadotéridol (Newton et Jiménez, 2009). Cette affirmation est fautive puisqu'aucune libération de Gd³⁺ dissocié n'a été observée dans le cas des CGs macrocycliques contrairement aux CGs linéaires, y compris ioniques. Enfin, ces auteurs indiquent que cette troisième hypothèse ne prend pas en compte les autres facteurs associés de la maladie (tels que l'état inflammatoire...) (Newton et Jiménez, 2009), nos résultats et ceux de Frenzel et coll. (2008) montrent que cet argument n'est pas valide.

A cette troisième hypothèse est liée une autre question importante, qui concerne la nature (soluble ou insoluble) et « toxicologiquement » active, du gadolinium dissocié retrouvé dans les biopsies humaines et animales.

7.4 Dissociation des complexes de gadolinium

Afin d'éviter la libération de Gd³⁺ dissocié et de ligand libre, il est essentiel que les complexes de gadolinium soient **très stables**. Comme nous l'avons vu précédemment, dans des conditions physiologiques, la quantité de Gd³⁺ libérée dépend, à la fois, des stabilités thermodynamique et cinétique. La question de la stabilité des CGs reste un sujet très débattu. Dès leur communication *princeps*, en janvier 1985, sur l'acide gadotérique, un CG macrocyclique et ionique, Bonnemain et Meyer (1985) ont souligné l'importance de la stabilité des complexes afin de réduire la toxicité de l'ion Gd³⁺.

Dans un premier temps, nous nous sommes donc intéressés à la dissociation éventuelle des CGs *in vitro*, dans un milieu biologique qu'est le sérum, puis *in vivo* dans plusieurs tissus sur différents modèles d'insuffisance rénale chez le Rat.

La dissociation des CGs *in vitro* a été évaluée de manière **indirecte** (dans la mesure où nous mesurons un temps de relaxation et non une concentration de Gd³⁺ dissocié), par la technique de **relaxométrie**. Notre approche était basée sur le postulat suivant : selon sa forme, le Gd n'interagit pas de la même manière avec les protons qui l'entourent. Lorsqu'il est sous forme dissocié et soluble, il interagit plus facilement avec ces protons car le Gd « libre » possède, au maximum, 9 sites de coordinations avec les protons, contrairement au

Gd complexé des CGs actuellement commercialisés, qui n'en possède qu'un seul. Dans ce cas, une augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale R_1 est observée et donc une augmentation de la valeur de la constante de relaxivité r_1 . A l'inverse, lorsque le Gd est sous forme précipitée (sous forme de phosphate de Gd, par exemple), une diminution de la vitesse de relaxation R_1 , qui tend vers la valeur du diamagnétique (c'est-à-dire la valeur de l'échantillon biologique en l'absence du produit de contraste), est observée et la constante de relaxivité r_1 tend alors vers zéro.

Nos travaux montrent une augmentation de la vitesse de relaxation R_1 dans du sérum de Rat et du sérum humain, au cours du temps, uniquement dans le cas du **CG linéaire et non ionique, gadodiamide**. Cette augmentation de la relaxivité suggère une **dissociation progressive** de ce produit dans du **sérum** à un pH et une température physiologiques, avec libération de **Gd³⁺ dissocié sous forme soluble**. L'effet est plus rapide dans le sérum de Rat (l'augmentation de R_1 survient dès la 1^{ère} heure) que dans le sérum humain (où elle survient à partir de la 8^{ème} heure), mais les augmentations de R_1 deviennent semblables chez les deux espèces à 24 heures (+16% par rapport à T0 pour les deux espèces). Nous n'avons pas d'explication précise pour cette différence qui est probablement liée à des différences de compositions des sérums. En revanche, les deux **CGs macrocycliques testés**, acide gadotérique et gadobutrol, **restent stables** au cours du temps, aucune variation de la vitesse de relaxation R_1 n'ayant été notée. Ces résultats sont **cohérents** avec les données publiées par **Frenzel** et ses collaborateurs (2008). Dans leur étude, la stabilité des différentes catégories de CGs a été évaluée dans du **sérum humain**, à 37°C, durant 15 jours, par une méthode de chromatographie, CLHP, couplée à une méthode élémentaire, la spectrométrie de masse (**CLHP-SM**). Ils ont ainsi montré la **libération progressive de Gd³⁺ dissocié** dans du sérum humain, uniquement dans le cas de des **CGs linéaires**. Les CGs macrocycliques, quant à eux, sont restés stables tout au long de l'étude. L'effet a été beaucoup **plus important** dans le cas des CGs linéaires **non ioniques** par rapport aux CGs linéaires ioniques (libération Gd³⁺ dissocié 10 fois supérieure à 15 jours). La dissociation du gadodiamide a débuté à partir de 2 jours d'incubation puis a cru jusqu'à la fin de l'étude. A 15 jours, 20% et 25% du Gd total étaient libérés sous forme dissociée dans le cas du gadodiamide et du gadodiamide non formulé, respectivement.

L'effet « dissociant » d'une **concentration élevée de phosphate** a également été étudié par Frenzel et ses collaborateurs (2008). Elle a été ajustée à **10 mM** à partir d'une concentration physiologique proche de 1,1 mM, soit quasiment 10 fois plus importante. Chez des patients hémodialysés, une augmentation de la phosphatémie est courante et elle s'explique par la diminution de l'excrétion rénale du phosphate. Dans ce cas, la phosphatémie peut atteindre une valeur de 3 mM (Albaaj et Hutchinson, 2003). L'ajout de phosphate induit une **accélération de la libération de Gd³⁺** pour tous les CGs linéaires, avec un effet plus important pour les non ioniques (Frenzel et coll., 2008). Après 15 jours, environ 35% du Gd total étaient dissociés dans le cas du gadodiamide. Nos données sont parfaitement cohérentes avec cette

étude. En effet, dans nos conditions expérimentales, l'ajout d'une concentration élevée de phosphate (10 mM également) **accélère l'augmentation de la vitesse de relaxation R_1** observée dans le cas du gadodiamide, ce qui suggère un **effet sensibilisant du phosphate** dans la dissociation de cet agent, dans du sérum de Rat et humain à 37°C.

Il a été préalablement montré qu'en présence d'un excès de phosphate, le **Gd dissocié**, issu du gadodiamide ou d'autres CGs linéaires (gadoversétamide et acide gadopentétique), **se combine au phosphate** pour former du **phosphate de Gd** dans une **solution aqueuse** (Laurent et coll. 2001 ; 2006 ; 2010 ; Robic et coll., 2011). Ce sel étant très peu soluble, il n'interfère quasiment pas avec le temps de relaxation. Par conséquent, on observe une **diminution de la vitesse de relaxation R_1** (Laurent et coll., 2001). La présence de **cations endogènes** tels que le **zinc**, le cuivre ou le calcium dans le milieu réactionnel peut **accélérer** la cinétique de libération de Gd^{3+} , soit en **catalysant** l'échange de ligands entre le phosphate et le ligand DTPA-BMA du gadodiamide, soit en induisant un mécanisme de **transmétallation** (Robic et coll., 2011).

Une étude *in vitro* a montré la **liaison** du **gadodiamide non formulé** et d'un **sel soluble de Gd** ($GdCl_3$) à des **cellules** tumorales en culture et un **passage intracellulaire** du Gd (Cabella et coll., 2006). Grâce à la relaxométrie et à la spectrométrie de masse, ces auteurs ont montré que seulement une **faible quantité du complexe intact** du gadodiamide est internalisée dans les cellules, suggérant une internalisation principalement de Gd^{3+} dissocié. Par ailleurs, lorsque le phosphate est supprimé du milieu de culture, l'internalisation du Gd est fortement diminuée, en présence de gadodiamide non formulé. Ces résultats suggèrent ainsi un phénomène de **transmétallation** du gadodiamide non formulé, qui serait **dépendant du phosphate**.

Dans nos conditions expérimentales, au lieu d'une diminution de la relaxivité du gadodiamide, nous avons constaté une augmentation de ce paramètre, cohérente avec la **présence de Gd^{3+} sous forme soluble**. La faible solubilité des lanthanides dans l'eau et leur précipitation en présence de phosphate ou de carbonate dans une solution aqueuse est bien connue (Evans, 1990). En revanche, dans un milieu biologique tel le **sérum**, les **protéines** présentes **réduisent la probabilité de précipitation** des lanthanides (Evans, 1990 ; Kanapilly, 1980). En effet, des lanthanides sont plus solubles dans le sérum que dans l'eau (Evans, 1990 ; Kanapilly, 1980) (**Tableau 42**). Ils peuvent ainsi former des **complexes solubles** avec des ligands présents dans le sérum. Les ligands possibles sont des phospholipides, des glycosaminoglycanes (comme l'héparine), des aminoacides, des peptides, des **protéines** ou encore des nucléotides (Evans, 1990). Parmi les protéines, l'albumine, les immunoglobulines, ou encore le fibrinogène peuvent interagir avec les lanthanides (Evans, 1990).

Table 1. Precipitation of Ln(III) at pH 7.3–7.4 from various solvents

Solvent	% Precipitated			
	$^{144}\text{Ce(III)}$	$^{90}\text{Y(III)}$	$^{169}\text{Yb(III)}$	$^{171}\text{Tm(III)}$
Synthetic Ultrafiltrate (SUF)	95	90	86	87
SUF without phosphate	1	2	3	5
SUF without phosphate and citrate	92	86	88	85
SUF without carbonate and citrate	98	91	89	97
Dog serum	2	1	3	4
Distilled water	7	12	11	13

Tableau 42 : Précipitation de 0,01 mM de quatre Ln (Ce, Y, Yb, Tm) dans différents milieux à pH 7,3-7,4 (Kanapilly 1980). L'ultrafiltrat synthétique de sérum (SUF) est composé de : chlorure de sodium, chlorure d'ammonium, glycine, cystéine, sulfate, bicarbonate de sodium, citrate trisodique, dihydrogénophosphate de sodium, chlorure de calcium et d'un antibactérien.

Les travaux de Kanapilly (1980) (**Tableau 42**) montrent que :

- A la concentration de 0,01 mM, quatre lanthanides (le Gd n'a pas été testé) sont soluble dans le sérum de chien et dans une moindre mesure, dans l'eau distillée ;
- Dans du sérum synthétique ultrafiltré, ces lanthanides précipitent fortement ;
- En l'absence de phosphate, cette précipitation disparaît, ce qui démontre la formation de phosphate de Ln insoluble.
- Cependant, en l'absence de phosphate et de citrate, un précipité de Ln réapparaît, ceci suggère que l'anion citrate pourrait masquer la formation d'un précipité avec un autre anion. Les données expérimentales de Kanapilly ne permettent pas de définir quel est l'autre anion mis en jeu. En l'absence de groupes Ln sans phosphate, citrate et carbonate, Ln sans carbonate et Ln sans citrate, il n'est pas possible de conclure.

Dans le cas d'un **sel soluble de Gd** (testé à la même concentration que les CGs commercialisés et donc, à une forte concentration), nous avons observé une **diminution de la relaxivité** au cours du temps, qui suggère la **précipitation du Gd**. De plus, en présence d'une forte concentration de phosphate, la diminution de la relaxivité est accélérée. Lorsqu'un sel soluble de Gd est incubé dans du **sérum sans protéines** (sérum après ultracentrifugation), **l'effet est accentué**. Le Gd pourrait ainsi précipiter plus rapidement en l'absence de protéines, ce qui suggère qu'à la fois **les protéines** et **des anions comme PO_4^{3-}** interagissent, dans un sens opposé, avec **l'ion Gd^{3+}** . Selon Evans (1990) et Durbin et coll. (1956), la capacité de complexation maximale du plasma pour les lanthanides serait d'environ 12 $\mu\text{mol/L}$ (résultats identiques pour trois lanthanides : Ce, Tm, Eu). Au-delà, des précipités colloïdaux se forment. Nous supposons donc qu'à la forte concentration testée (1 mM), le Gd est en partie lié aux protéines sériques qui « ralentissent » la précipitation du Gd sous forme insoluble. En revanche, l'effet des protéines disparaît après

ultracentrifugation, ce qui explique la formation immédiate d'un précipité et la chute concomitante de la valeur de R_1 . Nous pouvons spéculer que si nous avions testé le sel de Gd soluble à une concentration beaucoup plus faible, tout le Gd^{3+} aurait été lié aux protéines (donc sous forme soluble) et n'aurait ainsi pas pu précipiter. Des études complémentaires sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, **en l'absence de protéines**, nous ne constatons pas d'**augmentation** de la **relaxivité** du **gadodiamide**, ce qui suggère également une **liaison du Gd^{3+} dissocié aux protéines sériques**.

Dans un rapport non publié (Maton et coll., 1995), une **augmentation de la relaxivité** du **gadodiamide** et du **gadodiamide non formulé** à hauts champs magnétiques a été rapportée **après 24 heures** d'incubation dans du **sérum humain** (Maton et coll., 1995). Ces résultats suggèrent également une **interaction entre l'ion Gd^{3+} et les protéines humaines**, qui serait la conséquence d'une dissociation partielle de ces complexes (Maton et coll., 1995). Ces données montrent aussi que la formulation du gadodiamide n'influence pas la stabilité du complexe dans du sérum humain. Néanmoins, aucune modification de la relaxivité au cours du temps n'a été observée dans un mélange de protéines. Les auteurs ont éliminé l'hypothèse d'une dissociation non covalente du complexe lui-même avec des protéines en effectuant des mesures de temps de corrélation rotationnelle (τ_R) des complexes. Les valeurs de τ_R de l'acide gadopentétique et du gadodiamide ont évolué de la même manière entre l'eau et le sérum. Ils n'ont pas identifié de modification des valeurs de τ_R dans le temps. De plus, l'acide gadopentétique est très hydrophile (Port et coll., 2008) ; une liaison de la molécule elle-même est peu probable. La légère augmentation de la valeur du (τ_R) entre l'eau et le sérum a été attribuée à un effet viscosité (ou microviscosité). Ceci permet d'éliminer l'hypothèse de liaison du gadodiamide lui-même aux protéines sériques (Maton et coll., 1995).

Une étude récente (Taupitz et coll., 2013) a montré la dissociation partielle des CGs linéaires et non des CGs macrocycliques. En **présence de zinc** et **d'héparine**, un **complexe Gd-héparine** se forme et induit ainsi une augmentation de la relaxivité (par rapport à celle mesurée dans l'eau) d'un facteur variant de 5,1 à 7,7 pour les CGs linéaires non ioniques, et de 1,5 à 1,7 pour les linéaires ioniques. Dans le cas d'un sel soluble de Gd ($GdCl_3$), la relaxivité est augmentée d'un facteur 8,7 dans un milieu contenant du zinc et de l'héparine par rapport à celle mesurée dans l'eau. Ces travaux suggèrent ainsi une transligation du Gd^{3+} à l'héparine. En fait, en présence de zinc, intervient une transmétallation entre le Gd et le Zn pour les CGs linéaires ; le Gd^{3+} ainsi dissocié se lie à l'héparine, ce qui explique l'augmentation de la valeur de la constante de relaxivité r_1 . En revanche, ce phénomène n'est pas observé en présence de CGs macrocycliques. L'héparine est un **glycosaminoglycane (GAG)**. Les GAGs sont des constituants de la MEC et leur concentration

plasmatique est augmentée en cas d'insuffisance rénale (Friman et coll., 1977 ; Hällgren et coll., 1987).

Nous proposons l'hypothèse suivante pour expliquer le rôle accélérateur du phosphate dans la libération du Gd^{3+} sous forme soluble à partir du gadodiamide dans du sérum. Elle est schématisée dans la **Figure 115** ci-dessous.

Quatre entités interviennent dans cette hypothèse : le gadodiamide (DTPA-BMA-Gd), le Gd^{3+} qui en est dissocié et qui est lié à une protéine (« Gd-protéine liaison 1 »), le Gd^{3+} dissocié et lié soit à une protéine distincte soit à un second site de la protéine précitée (« Gd-protéine 2 ») et enfin le phosphate de Gd.

Chacune de ces entités chimiques possède un niveau d'énergie distinct. Plus le niveau d'énergie est bas et plus l'entité sera présente à l'équilibre thermodynamique. Le passage d'une entité chimique à une autre nécessite le passage d'une énergie d'activation, représentée par la barrière énergétique (E_a) sur le schéma ci-dessous (**Figure 115**). Les cinétiques de dissociations sont régulées par ces énergies d'activation.

Dans notre hypothèse, le Gd^{3+} dissocié à partir du gadodiamide pourrait se lier rapidement à une protéine sérique et conduire à l'entité « complexe Gd-protéine 1 ». Ce complexe serait plus stable thermodynamiquement que le gadodiamide et serait formé avec une cinétique rapide *via* le passage d'un faible niveau d'énergie. Une fois ce site saturé, le Gd^{3+} s'associerait à une seconde protéine (ou à un second site de liaison). Ce phénomène nécessiterait un niveau d'énergie plus important. Par conséquent, le complexe (« Gd-protéine 2 ») se formerait beaucoup plus lentement que « Gd-protéine 1 ». Cette seconde liaison pourrait expliquer la lente augmentation de la relaxivité observée, après la phase rapide initiale (**Figure 115**). En revanche, en présence d'une concentration élevée de phosphate dans le sérum, le Gd^{3+} se combinerait à cet anion en formant une entité intermédiaire (le sel $GdPO_4$) qui nécessiterait une énergie plus faible que le complexe « Gd-protéine 2 », mais qui serait thermodynamiquement moins stable. Ce sel serait un stade intermédiaire avant la formation du second complexe Gd-protéine et pourrait ainsi faciliter sa formation (**Figure 115**).

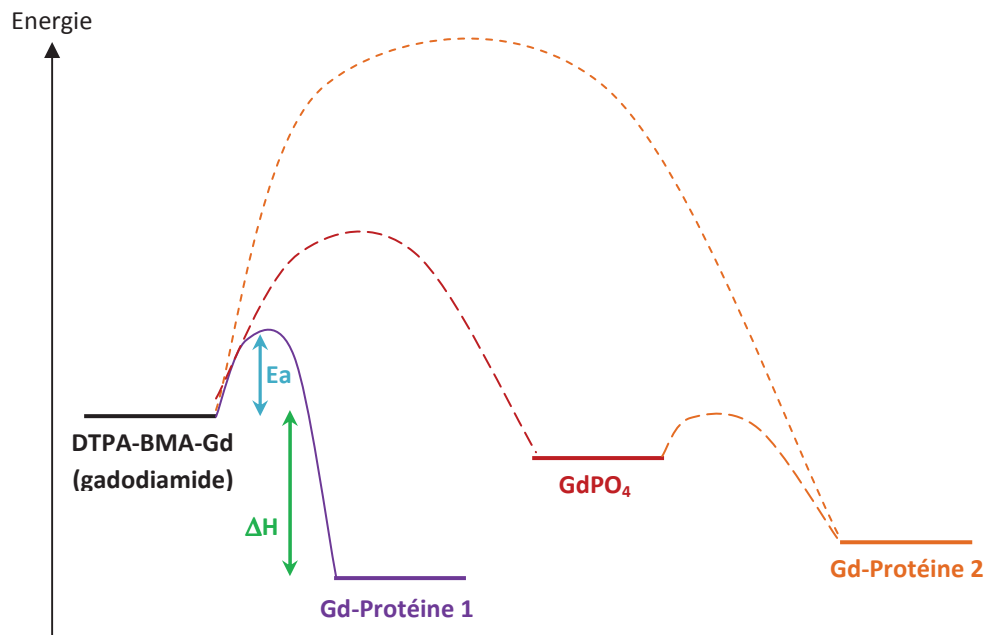


Figure 115 : Variation de l'énergie au cours de la formation des différentes entités chimiques formées après incubation de gadodiamide dans du sérum en présence d'une forte concentration de phosphate ou non.

E_a : barrière d'énergie ou énergie d'activation ; ΔH : gain d'énergie d'enthalpie.

Plusieurs études (Laurent et coll., 2001 ; Laurent et coll., 2010 ; Robic et coll., 2011 ; Taupitz et coll., 2013) ont montré **le rôle du zinc** (catalyseur de la transmétallation en présence d'une forte concentration de phosphate dans l'étude Robic et coll., 2011 ou transmétallation pour les autres auteurs) dans la dissociation des CGs linéaires et notamment du gadodiamide, dans **un milieu aqueux**. Nous envisageons donc de mener des études de dissociation *in vitro* en présence d'un excès de zinc dans un milieu biologique comme cela a pu être effectué avec le phosphate.

Dans notre étude, les résultats sont apparus **très différents** selon que les études ont été réalisées dans du **sérum humain** ou du **sérum humain lyophilisé** puis reconstitué (séronorm). En effet, une dissociation du gadodiamide a été observée dans le sérum humain alors qu'aucun effet n'a été noté dans le séronorm. En revanche, après ajustement à une concentration élevée de phosphate (10 mM), nous avons noté une dissociation du gadodiamide dans le séronorm et une accélération de celle observée dans le sérum humain. Il conviendrait de tester toutes les catégories de CGs et un sel de Gd soluble dans du sérum humain et non dans le séronorm comme nous l'avons effectué dans notre étude.

Dans notre étude, nous n'avons observé aucune dissociation *in vitro* de l'acide gadopentétique dans du séronorm en présence d'une concentration élevée ou non de phosphate. Or, ce CG est un complexe linéaire d'une stabilité cinétique inférieure à celle des CGs macrocycliques. Il a déjà été démontré qu'il se dissocie dans du sérum humain (Frenzel et coll., 2008). Il est donc difficile de conclure sur la base de nos seules données dans le séronorm et il semble nécessaire de l'étudier sur du sérum humain non lyophilisé.

Dans le cas des deux CGs macrocycliques testés (acide gadotérique et gadobutrol), aucune modification de la valeur de R_1 n'a été observée dans du plasma de Rat, ce qui confirme l'excellente stabilité des complexes macrocycliques dans un milieu biologique.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché l'existence d'une **dissociation** de toutes les catégories de CGs commercialisés non plus *in vitro*, mais sur **différents modèles d'insuffisance rénale chez le Rat**, pour être proche des conditions cliniques. Nous avons, pour cela, choisi deux techniques distinctes et complémentaires : le dosage de Gd^{3+} dissocié dans le plasma des rats, selon la méthode décrite par Frenzel (Frenzel et coll., 2008), la **CHLP-SM** et, l'étude de la **relaxivité** des tissus solides, par relaxométrie.

Nos données ont, d'abord, mis en évidence la **présence de Gd^{3+} dissocié et soluble** dans le plasma de tous les rats ayant reçu **du gadodiamide mais pas l'acide gadotérique, CG macrocyclique beaucoup plus stable**. Dans un modèle d'insuffisance rénale par néphrectomie des 5/6^e (où la fonction rénale était assez faiblement réduite (-60% par rapport aux témoins), **environ 60%** du gadolinium total, dosé 6 jours après la dernière administration de gadodiamide, était **sous forme dissociée**. En revanche, dans un modèle d'insuffisance rénale plus sévère (-95% par rapport aux témoins) et stable (administration d'adénine), **100%** du Gd total, dosé 4 jours après la dernière injection, était **sous forme dissociée** et la concentration de Gd^{3+} était également largement supérieure à celle mesurée après néphrectomie des 5/6^e.

La présence de Gd^{3+} dissocié dans le plasma n'a été observée que chez un seul rat dans le groupe ayant reçu l'acide gadopentétique et également chez un rat du groupe ayant reçu l'acide gadobénique, deux CGs linéaires et ioniques, thermodynamiquement plus stables que le gadodiamide. De plus, les concentrations de Gd dissocié étaient nettement inférieures à celle observée dans le plasma de rats ayant reçu le gadodiamide.

Chez les rats ayant reçu les CGs macrocycliques, l'acide gadotérique et le gadobutrol, nous n'avons pas détecté de Gd^{3+} dissocié dans le plasma, ce qui confirme la haute stabilité de ces molécules.

A ce jour, le seul tissu dans lequel le dosage de Gd^{3+} dissocié est possible est le plasma. Nous sommes donc obligés de recourir à une approche « indirecte » pour rechercher la présence de Gd^{3+} dissocié dans les tissus solides. L'étude de la relaxivité permet de définir l'état du Gd (complexé, dissocié et soluble ou dissocié et précipité) présent dans les tissus, comme nous l'avons vu précédemment.

Une augmentation progressive et significative de la constante de relaxivité r_1 , dans la peau et le fémur des rats ayant reçu du **gadodiamide**, montre que le Gd présent dans ces tissus est dissocié avec une libération (non quantifiable, ce qui est une limite de cette technique) de Gd sous forme de **Gd^{3+} dissocié et soluble**. Cet effet est retrouvé dans tous les modèles *in vivo* que nous avons étudiés. Une **augmentation de la constante de relaxivité r_1** a été également observée dans la peau et le fémur des rats recevant **l'acide gadopentétique**, un

CG linéaire et ionique, suggérant, là aussi, une dissociation *in vivo* de ce complexe avec libération de Gd^{3+} dissocié et soluble.

Nous avons mesuré une augmentation de la **relaxivité r_1** dans la peau, le fémur et le foie de certains rats traités avec de **l'acide gadobénique**, un autre CG linéaire et ionique. Ces résultats peuvent suggérer une dissociation *in vivo* de ce produit, mais ils peuvent aussi s'expliquer par la liaison de la molécule intacte aux protéines, qui est une caractéristique de cet agent (Cavagna et coll., 1997). En effet, la liaison protéique du complexe lui-même augmente sa relaxivité car elle conduit à la formation d'un adduit macromoléculaire, qui augmente sa taille moléculaire et son temps de corrélation rotationnelle.

D'une manière générale, les constantes de relaxivité r_1 des deux CGs macrocycliques étudiés, **l'acide gadotérique** et le **gadobutrol**, sont restées globalement **inchangées *in vivo*** et ont été inférieures à celles du gadodiamide et de l'acide gadopentétique. Par ailleurs, pour de nombreux animaux ayant reçu un CG macrocyclique ou de l'acide gadobénique, les concentrations tissulaires de Gd total ont été insuffisantes pour induire un effet détectable par relaxométrie, ne permettant la détermination de la constante de relaxivité r_1 que pour très peu d'animaux. Une analyse statistique par mesure répétée n'a pas donc pu être réalisée pour ces différents groupes.

Ainsi, dans notre étude sur un modèle d'insuffisance rénale sévère et stable (section 6.3.2), la détermination de la constante de relaxivité r_1 *in vivo* au sacrifice du groupe ayant reçu de l'acide gadotérique n'a pu être réalisée que pour un seul rat, souffrant d'hydronephrose et quasiment anurique, ce qui a donc induit une rétention accrue du CG. Il est donc difficile de tirer des conclusions sur la base d'une seule valeur de constante de relaxivité à ce délai.

Dans cette même étude, l'augmentation de la constante de relaxivité r_1 *in vivo* consécutive à l'administration de gadodiamide est plus importante pour le groupe témoin non insuffisant rénal que pour le groupe insuffisant rénal. Cet effet paradoxal peut être expliqué de deux manières. La première possibilité est que la concentration de Gd total dans la peau de ces rats non insuffisants rénaux est très faible et qu'il serait totalement dissocié contrairement à ce qui se passe chez le Rat insuffisant rénal où une partie du Gd serait toujours sous forme complexée car les concentrations de Gd total sont nettement plus élevées. La deuxième explication est que la référence de peau témoin, qui permet de calculer le T_1 diamagnétique (tissu issu de rats témoins sans injection de CG), ne permet pas une comparaison rigoureuse. En effet, nous avons noté que la peau du groupe non insuffisant rénal est plus épaisse que la peau de rats insuffisants rénaux, ce qui pourrait interférer avec la mesure réalisée par relaxométrie. Par ailleurs, la diminution de la valeur de r_1 observée en fin d'étude pourrait être liée à une élimination progressive du gadolinium (sous forme complexée et/ou dissociée) ou à la précipitation du Gd^{3+} dissocié sous forme de phosphate de Gd insoluble.

La **présence de dépôts insolubles de gadolinium** a été observée dans des biopsies de peau et d'autres organes de patients souffrant de FSN et ayant reçu un **CG linéaire** (Abraham et

coll., 2008 ; Boyd et coll., 2007 ; George et coll., 2010 ; High et coll., 2007). De plus, le Gd est souvent associé à **du phosphate**, suggérant la **présence de GdPO₄ insoluble**, ou à du calcium, parfois à du fer et du zinc (Abraham et coll., 2008 ; Boyd et coll., 2007 ; George et coll., 2010 ; High et coll., 2010 ; Thakral et Abraham, 2009).

En revanche, nos études n'ont pas permis de mettre en évidence la présence *in vivo* d'un sel insoluble de Gd au niveau tissulaire. En fait, la relaxométrie nous a permis de détecter la présence de Gd³⁺ dissocié sous forme soluble car nous avons observé une augmentation de relaxivité. Ce résultat n'est pas incompatible avec la présence d'autres formes de Gd (complexée, dissocié et insoluble).

Les données *in vitro* de la littérature ainsi que les résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus dans cette thèse mettent en évidence une **dissociation partielle et progressive des CGs linéaires**, avec un effet **plus important** pour les CGs linéaires **non ioniques** que pour les complexes ioniques. En revanche, les **CGs macrocycliques** étudiés sont restés **stables** et donc aucune libération de Gd³⁺ dissocié n'a été détectée, quelles qu'aient été les conditions expérimentales. Ces données sont cohérentes avec la clinique humaine (Bennett et coll., 2012 ; Perazella, 2008 ; Rodby, 2011).

Ces résultats **reflètent les stabilités thermodynamique et cinétique** des CGs. En effet, aucune dissociation des CGs macrocycliques n'est détectée alors que la stabilité cinétique de ces agents est nettement supérieure à celle des CGs linéaires (voir section 2.8.2). De plus, la dissociation est plus importante dans le cas des CGs linéaires non ioniques par rapport aux CGs linéaires ioniques. Or, la stabilité thermodynamique (Log K_{cond}) des CGs ioniques est généralement supérieure à celle des CGs non ioniques (voir section 2.8.1). Par conséquent, ces données confirment que la quantité de Gd³⁺ libérée dépend, à la fois, des stabilités thermodynamique et cinétique et qu'il est essentiel que les CGs soient très stables afin de ne pas libérer de Gd³⁺ toxique *in vivo*.

De nombreuses études *in vitro* ont montré des effets **profibrosants** du **gadolinium « libre »**. Le **Gd sous sa forme soluble** (GdCl₃) (Bhagavathula et coll., 2010 ; Varani et coll., 2009) ainsi que **d'autres lanthanides** (Jenkins et coll., 2011) peuvent directement activer la prolifération des fibroblastes en culture (**Figure 116**). Le ligand DTPA bloque la prolifération des fibroblastes humains induite par le Gd « libre » (Varani et coll., 2009).

Une augmentation de la **synthèse de collagène** et de l'acide hyaluronique par des fibroblastes a également été démontré par le Gd³⁺ soluble et des CGs linéaires (DaSilva et coll., 2010 ; Edward et coll., 2010 ; Piera-Velazquez et coll., 2010), néanmoins, l'augmentation du collagène n'est pas toujours retrouvée (Edward et coll., 2010 ; Riser et coll., 2012 ; Varani et coll., 2009) et peut être la conséquence d'une prolifération des fibroblastes (MacNeil et coll., 2011). De plus, **les lanthanides**, comme le samarium, peuvent **accélérer la polymérisation du collagène *in vitro*** (Drouven et Evans, 1986). Dans un pré-essai, nous avons confirmé ces résultats par des études de turbidimétrie et de microscopie

électronique en transmission, avec le **chlorure de samarium** et l'**acétate de gadolinium**, un sel soluble de Gd (données non présentées ici). En revanche, des **métaux de transitions** (l'aluminium, le cuivre, le cobalt, le fer, le magnésium, le manganèse, le nickel, et le zinc) **n'induisent pas** la prolifération des fibroblastes (Jenkins et coll., 2011).

De même, le **Gd insoluble** (GdPO_4) peut directement **stimuler la prolifération** des fibroblastes en culture (Bleavins et coll., 2012). Il pourrait **libérer progressivement du Gd soluble** (Li et coll., 2010 ; Li et coll., 2012).

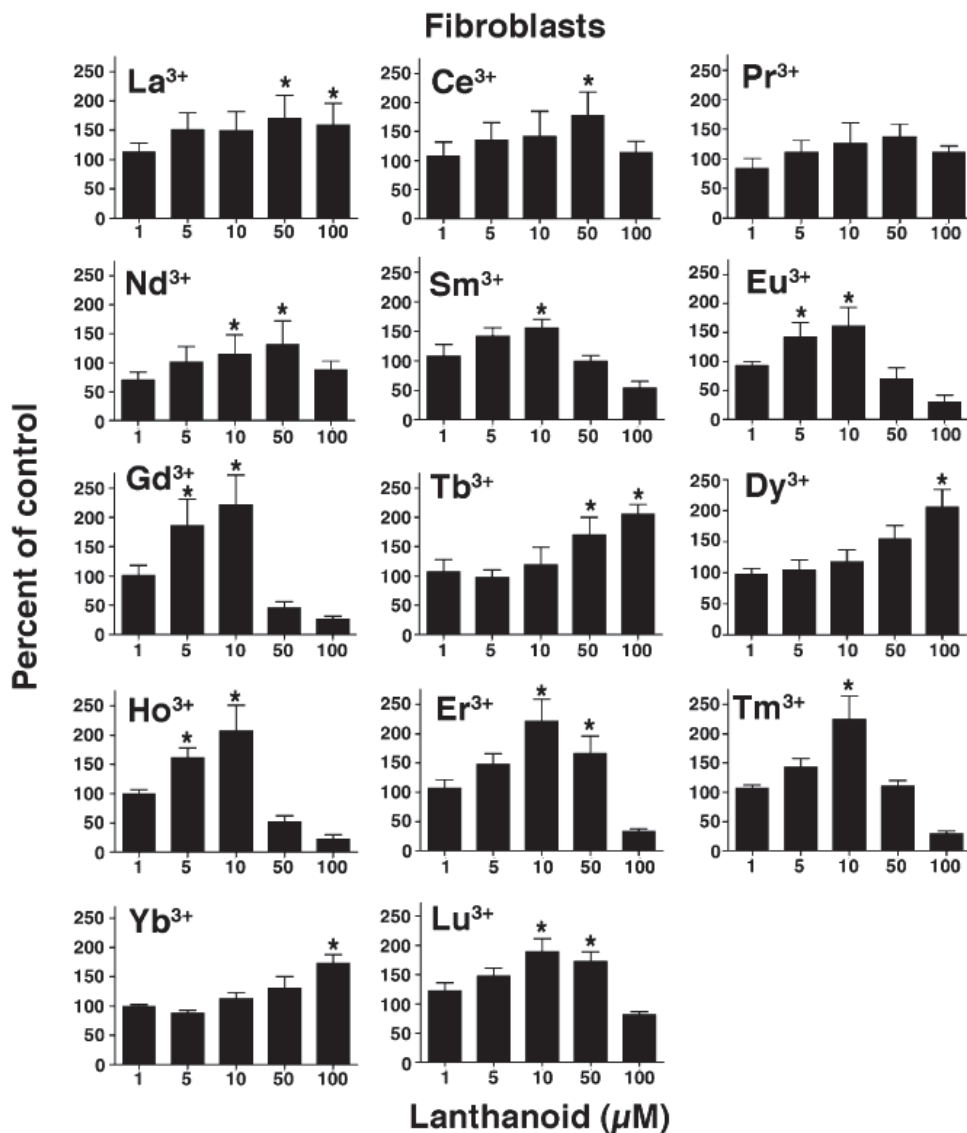


Figure 116 : Effet de différents lanthanides sur la prolifération des fibroblastes humains en culture (Jenkins et coll., 2011)

Un effet prolifératif des **CGs linéaires peu stables** a également été montré (Edward et coll., 2008 ; Varani et coll., 2009). Les mêmes voies de signalisation sont activées après traitement avec le gadodiamide et le Gd « libre » et soluble (voies de signalisation PI3K, ERK, MAPK, PDGF) (Bhagavathula et coll., 2010). Selon Li et coll., (2010), le GdCl_3 a un effet prolifératif

logiquement plus prononcé à 50 μM que le gadodiamide à 100 μM sur des fibroblastes d'embryon de poulet.

Par conséquent, le Gd « libre » présentant des propriétés profibrosantes, nous nous sommes intéressés aux conséquences cliniques éventuelles de la dissociation des CGs linéaires peu stables. Pour cela, nous avons comparé sur différents modèles d'insuffisance rénale chez le Rat les effets des toutes les catégories de CGs commercialisés, qui diffèrent par leurs stabilités cinétiques et thermodynamiques.

7.5 Modèles in vivo de fibrose systémique néphrogénique

Pour être proche des conditions cliniques, il nous est apparu essentiel de travailler sur des **animaux insuffisants rénaux**, même si d'autres équipes ont choisi d'administrer de fortes et/ou de multiples doses de CG chez des animaux naïfs afin de mimer une exposition prolongée au CG (Sieber et coll., 2008a et 2008b ; Pietsch et coll., 2011a).

Nous avons caractérisé chaque modèle par un suivi temporel de la fonction rénale (détermination de la **clairance de la créatinine**), et des paramètres hématologiques et biochimiques. Néanmoins, pour des raisons techniques, nous avons évalué la fonction rénale des rats uniquement par **mesure de la créatinémie** dans les études ultérieures ayant impliqué l'administration de produits.

Dans un premier temps, nous avons choisi un modèle d'insuffisance rénale par **néphrectomie des 5/6^e**, classiquement utilisé comme un modèle de fibrose rénale (Fleck et coll., 2006). Ce modèle est utilisé par les autres équipes étudiant la FSN (Grant et coll., 2009 ; Haylor et coll., 2010 ; Haylor et coll., 2012 ; Pietsch et coll., 2009a). Ainsi, il nous a été possible de comparer nos résultats à ceux de la littérature.

Une **forte morbi-mortalité**, la présence de **lésions cutanées macroscopiques** et des **lésions importantes du collagène** ont été observées chez les rats ayant reçu le **gadodiamide non formulé** (c'est-à-dire, sans l'excès de ligand présent dans la solution pharmaceutique).

De plus, une **inflammation systémique** a été observée (libération plasmatique de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β et de la chimiokine MCP-1 et hyperleucocytose). MCP-1 présente aussi des propriétés profibrosantes (Distler et coll., 2009). Tous ces résultats sont parfaitement cohérents avec la littérature. Ainsi, une mortalité élevée et des lésions cutanées (macroscopiques et histologiques) pour ce CG ont été rapportées lorsqu'il n'est pas formulé avec un ligand susceptible de complexer le Gd³⁺ dissocié dans le flacon avant son administration (Grant et coll., 2009 ; Sieber et coll., 2008a). La survenue de lésions cutanées (épidermiques, hypercellularité, diminution de l'espace interstitiel) a également été décrite avec ce produit dans une étude plus récente (Pietsch et coll. 2011a). Les lésions étaient d'autant plus sévères et plus fréquentes que les administrations du produit étaient rapprochées. Par ailleurs, il a été montré que la sévérité des lésions cutanées et la rétention de Gd sont inversement corrélées à la quantité d'excès de ligand présent dans la solution

pharmaceutique (Sieber et coll., 2008c). Ces résultats sont donc en faveur d'un effet causal du Gd^{3+} dissocié présent dans la solution de gadodiamide administrée.

En revanche, **aucune lésion macroscopique** et **aucune toxicité** systémique n'ont été mises en évidence dans notre étude après administration **d'acide gadotérique** et de **gadodiamide formulé avec un excès de ligand** (caldiamide). Néanmoins, on soulignera la présence de petites lésions du collagène chez les rats du groupe gadodiamide.

Ces données démontrent la **forte toxicité du gadodiamide** lorsqu'il n'est **pas formulé** avec un excès de ligand et soulignent ainsi **l'importance de la stabilité** des CGs.

Ce modèle est donc intéressant mais il n'a pas permis de différencier concrètement les formes commerciales de l'acide gadotérique et du gadodiamide, ce qui n'est pas cliniquement pertinent car la grande majorité des cas de FSN sont associés au gadodiamide (Rodby, 2011).

Il a été suggéré que **l'hyperphosphatémie** pourrait être un **facteur associé** à la maladie (Marckmann et coll., 2007 ; Prince et coll., 2008) ; or, notre modèle de néphrectomie des 5/6^e ne présente pas d'hyperphosphatémie. De plus, la littérature (Frenzel et coll., 2008 ; Laurent et coll., 2001 ; Robic et coll., 2001) et nos données montrent qu'une concentration élevée de **phosphate** est un facteur **déclenchant et/ou sensibilisant** de la **dissociation** des CGs linéaires *in vitro*. Par conséquent, nous avons souhaité étudier plus spécifiquement **le rôle de l'hyperphosphatémie** chez le Rat insuffisant rénal après administration de gadodiamide, un CG peu stable qui se dissocie aisément et rapidement *in vitro* dans du sérum humain.

L'administration de nourriture enrichie en phosphate à des rats néphrectomisés des 5/6^e a induit une **hyperphosphatémie** et une **ostéite fibreuse**, forme la plus courante d'ostéodystrophie observée chez les patients insuffisants rénaux (Coladonato, 2005). Ce modèle semble donc cliniquement plus pertinent que le modèle de néphrectomie des 5/6^e.

Nos travaux montrent que **l'hyperphosphatémie** sensibilise le Rat insuffisant rénal aux **effets profibrosants du gadodiamide** et semble donc être un **facteur de risque** (et pas seulement un facteur associé) de la FSN. L'inflammation (macrophages) et la fibrose observées chez les animaux hyperphosphatémiques et ayant reçu du gadodiamide sont associées à une augmentation du marqueur central de la fibrose, **TGF β** , et de l'enzyme **TIMP-1**, un inhibiteur de la métalloprotéinase collagénolytique MMP-1. Ces deux marqueurs sont également surexprimés dans le derme de patients souffrants de FSN (Jiménez et coll., 2004 ; Kelly et coll., 2008 ; Kelly et coll., 2010 ; Schieren et coll., 2010). De plus, dans nos conditions, l'expression de la **prolyl-4-hydroxylase** est augmentée dans le derme des animaux traités par le gadodiamide, ce qui suggère la synthèse de néo-collagène. Ce résultat est cohérent avec une autre étude préclinique (Haylor et coll., 2012).

Cet effet « sensibilisant » du phosphate *in vivo* est en accord avec nos données de dissociation *in vitro* dans du sérum humain et avec celles décrites par Frenzel (Frenzel et coll., 2008). De plus, elles sont cliniquement pertinentes car une hyperphosphatémie a été notée chez les patients souffrant de FSN (Marckmann et coll., 2007 ; Prince et coll., 2008). Par ailleurs, les patients FSN présentent une **hypercalcémie** significativement plus élevée que les patients témoins en IRC (Marckmann et coll., 2007). En revanche, aucune modification de la calcémie n'est apparue dans notre étude. Nous pouvons donc spéculer sur une toxicité plus élevée d'une hyperphosphatémie associée à une hypercalcémie chez des rats insuffisants rénaux ayant reçu du gadodiamide.

Nous avons, par la suite, comparé **les 4 catégories structurales** de CGs commercialisés et testé les effets de **complexes de calcium** (d'un ligand linéaire et d'un ligand macrocyclique) sur ce nouveau modèle. Une **toxicité importante du gadodiamide** (lésions cutanées, accumulation tissulaire de Gd) et une dissociation *in vivo* notable ont été observées alors qu'**aucun signe** n'a été détecté dans **tous les autres groupes**. Il faut souligner que le Rat n'est pas l'espèce la plus pertinente pour étudier les effets de l'acide gadobénique. En effet, cet agent est éliminé à 50% par voie hépatique chez le Rat naïf (contre environ 4% chez l'Homme) (Lorusso et coll., 1999) alors que tous les autres CGs sont éliminés quasiment exclusivement par voie rénale (Oksendal et Hals, 1993). De plus, nous pouvons nous attendre à une excrétion hépatique accentuée en cas d'insuffisance rénale. Par conséquent, la clairance totale de ce produit est supérieure à celle des autres CGs.

Aucune lésion cutanée n'a été observée après administration de **deux complexes de calcium** (d'un ligand linéaire, le DTPA et d'un ligand macrocyclique, le DOTA), ce qui est cohérent avec d'autres études (Grant et coll., 2009 ; Sieber et coll., 2008b). Ces résultats montrent que les lésions de fibrose observées avec les CG peu stables ne sont pas dues à l'excès de ligand présent dans leur solution pharmaceutique.

Le modèle de néphrectomie des 5/6^e par chirurgie unique présentait l'inconvénient de **réduire la fonction rénale de façon relativement limitée** (- 60% par rapport aux témoins) Or, une étude (Haylor et coll., 2010) a montré que l'hypercellularité du derme est d'autant plus importante que l'insuffisance rénale est sévère, après administration de gadodiamide, même si ce lien n'a pas été retrouvé dans une étude clinique (Nazarian et coll., 2011). Un autre inconvénient de ce modèle est qu'il est nécessaire d'induire une hyperphosphatémie par le biais d'une alimentation enrichie en phosphate. De plus, nous n'avons pas réussi à discriminer les CGs de stabilités intermédiaires.

Nous avons alors choisi un nouveau modèle d'insuffisance rénale, par ajout **d'adénine** dans l'alimentation, décrit pour la première fois par Yokozawa et coll. (1986). L'adénine induit une insuffisance rénale en provoquant la précipitation de 2,8-dihydroxy-adénine (DHOA) dans la lumière des tubules rénaux (Koeda et coll., 1988 ; Okada et coll., 1999). L'adénine est, normalement, convertie en adénosine monophosphate (AMP) par l'adénine phosphoribosyl-

transférase (APRT), mais, si sa concentration est très élevée, l'APRT est saturée et une voie alternative se met en place. L'adénine est alors convertie en DHOA par la xanthine oxydase (Koeda et coll., 1988). Ce modèle présente l'avantage d'être associé à une hyperphosphatémie sans fibrose rénale.

L'administration orale d'adénine est associée à une **chute rapide de la fonction rénale**, qui survient dès la première semaine chez le Rat avec une perte de poids importante, comme cela est aussi rapporté dans la littérature (Okada et coll., 1999). Un intérêt considérable de ce modèle est qu'il est possible de moduler le degré de l'insuffisance rénale en faisant varier la durée du régime enrichi en adénine. Par ailleurs, ce modèle s'accompagne d'une **anémie tardive**, là aussi cohérente avec la littérature (Hamada et coll., 2008 ; Okada et coll. 1999). La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et le volume globulaire moyen (VGM) restant stables pendant toute la durée de l'étude, cette anémie est considérée comme **normochrome et normocytaire**. Elle est donc représentative de celle décrite chez les patients insuffisants rénaux (Babitt et Lin, 2010). L'ajout d'adénine dans la nourriture a également entraîné, selon les modèles (et la durée du régime enrichi en adénine), une **diminution significative de la concentration de fer plasmatique** tout au long de la durée du régime. Cet effet a aussi été décrit dans la littérature (Hamada et coll., 2008). Nous avons enfin observé une **hyperphosphatémie** après trois semaines de régime enrichi en adénine, qui est corrélée avec le degré d'insuffisance rénale. En effet, plus la fonction rénale est altérée, plus la phosphatémie est élevée.

Par conséquent, ce modèle nous est apparu très pertinent puisqu'il se traduit par une **insuffisance rénale pouvant être très sévère et proche de la pathologie humaine** (insuffisance rénale sévère, hyperphosphatémie, ostéodystrophie, anémie et hyposidérémie associée à l'anémie). D'autres possibilités de sensibilisation des animaux sont possibles, comme l'association d'EPO et de fer (Hope et coll. 2009).

Ce nouveau modèle nous a ainsi permis d'étudier **le rôle du degré d'insuffisance rénale**. Nous avons choisi de ne tester qu'un seul CG, à savoir le gadodiamide, ce CG linéaire et non ionique étant associé à la majorité des cas de FSN publiés à ce jour et étant très fréquemment choisi comme produit de référence dans la littérature (Cox et coll., 2010 ; Haylor et coll., 2010 ; Hope et coll., 2009 et 2013).

Dans nos conditions expérimentales, la **toxicité systémique** et les **lésions de fibrose** dues au **gadodiamide** sont **d'autant plus importantes** que la **fonction rénale** est **faible**. Ces données sont cliniquement pertinentes. En effet, la quasi-totalité des cas de FSN sont décrits chez des patients présentant une IRC sévère (stade 4) ou terminale (stade 5), nécessitant un traitement par dialyse (Abu-Alfa, 2011). A ce jour, il n'existe aucun cas publié et avéré de FSN chez des patients présentant une IRC de stade 3 (Abu-Alfa, 2011). De plus, nous avons observé la présence de foyers de calcification dans le derme des rats insuffisants rénaux sévères après injection de gadodiamide. Ce résultat est intéressant car des calcifications ont

été décrites dans la peau de patients souffrant de FSN et pourraient être associées à des métaplasies osseuses (Okada et coll., 2011).

Sur le modèle d'insuffisance rénale la plus sévère, une forte morbi-mortalité a été observée après administration de gadodiamide. Ce protocole est donc très sévère mais il pourrait permettre de discriminer les autres catégories de CGs, qui ont une stabilité supérieure à celle du gadodiamide.

Ainsi, toutes les catégories structurales de CGs ont été comparées sur ce modèle. Nous avons confirmé la **forte toxicité systémique** du **gadodiamide**, sa **forte rétention tissulaire de Gd** et sa **dissociation *in vivo***. Des lésions cutanées **punctiformes et transitoires** (disparition spontanée) sont apparues précocement chez des rats ayant reçu de **l'acide gadopentétique**, un CG linéaire et ionique, mais sans lésion de fibrose. Une **augmentation de la relaxivité *in vivo*** a été observée chez les rats ayant reçu ce produit, suggérant une **dissociation *in vivo*** avec libération de Gd^{3+} dissocié et soluble, comme observé pour le gadodiamide. Chez l'Homme, ce CG est également associé à des cas de FSN « purs » (Abujudeh et coll., 2009) et il est, également contre-indiqué chez les patients dont la fonction rénale estimée est inférieure à 30 mL/mn/1,73 m² aux USA (FDA, 2010) et en Europe (EMA, 2010). Une **concentration élevée du Gd total dans le fémur** a été observée chez les animaux ayant reçu l'acide gadopentétique, **équivalente** à celle mesurée chez le rat survivant ayant reçu du **gadodiamide** et largement **supérieure** à celle mesurée dans le fémur des groupes ayant reçu un **CG macrocyclique** ou l'acide gadobénique.

Aucune toxicité n'a été observée chez les rats ayant reçu de **l'acide gadotérique** et le **gadobutrol**, deux CGs macrocycliques, et **l'acide gadobénique**. Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, l'augmentation de la relaxivité chez certains rats ayant reçu de **l'acide gadobénique** peut suggérer une **dissociation *in vivo*** de ce produit, mais elle peut aussi s'expliquer par la **liaison de la molécule elle-même aux protéines circulantes**, qui est une caractéristique de cet agent (Cavagna et coll., 1997).

Nous avons ainsi montré une **forte toxicité systémique** (morbi-mortalité ; lésions de fibrose) du **gadodiamide** et des lésions cutanées macroscopiques **transitoires** avec **l'acide gadopentétique**. Par ailleurs, chez ces deux **CGs linéaires** dont les stabilités sont les plus faibles parmi celles des CGs étudiés, la **rétention de Gd** dans le tissu **osseux** était supérieure à celle des CGs macrocycliques et de l'acide gadobénique, suggérant une **accumulation** dans ce tissu. En clinique, une étude a montré une **concentration de Gd total** dans les os supérieure chez **des patients** ayant reçu un CG linéaire et non ionique, le gadodiamide, par rapport à celle mesurée dans les os de patients ayant reçu un CG macrocyclique, le gadotéridol (White et coll., 2006). Cette différence d'accumulation entre des CGs linéaires et des CGs macrocycliques a été confirmée dans de nombreuses études précliniques (Haylor et coll., 2012 ; Sieber et coll., 2008b ; Wadas et coll., 2010). Or, il a été proposé que les CGs soient séquestrés dans un **compartiment dit « profond »** caractérisé par une composition

particulière, en termes de protéines, ions, pH, etc. (Thakral et coll., 2007). Un profil pharmacocinétique tri-compartimental qui considère **le tissu osseux** comme un troisième compartiment « profond » a été proposé par Hirano et Suzuki (1996) dans le cas des CGs administrés par voie intraveineuse. Nous pouvons suggérer qu'un **pseudo-équilibre** entre le Gd^{3+} , le ligand et le CG soit atteint dans ce compartiment profond, résultant ainsi en la **libération progressive de Gd^{3+} dissocié**. La capacité des lanthanides comme le Gd à s'accumuler dans le tissu osseux est bien connue, mais le site exact de leur séquestration reste controversé (Hirano et Suzuki, 1996). Une liaison du Gd à l'hydroxyapatite de l'os a été proposée (Abraham et coll., 2008). Chez des rats insuffisants rénaux (néphrectomie sub-totale), et ayant reçu une administration orale de lanthane, cet élément a été essentiellement trouvé dans **la couche externe de l'os minéralisé** (Behets et coll., 2005). Nous avons dosé le Gd total et effectué la relaxométrie au niveau des deux épiphyses du fémur, donc de l'os essentiellement trabéculaire et de la moelle osseuse. Nous n'avons pas évalué séparément l'os compact et la moelle osseuse.

Des études de microscopie couplée à la spectrométrie de masse pourraient permettre de localiser les dépôts de Gd dans le tissu osseux.

Chez des patients souffrant d'ostéoporose, la concentration de Gd total inférieure dans l'os trabéculaire et l'os cortical de patients est inférieure à celle mesurée chez des patients souffrant d'arthrose (Darrach et coll., 2009). Cette différence peut s'expliquer de deux manières : (1) la formation osseuse étant diminuée chez les patients souffrant d'ostéoporose, le Gd serait plus difficilement retenu dans le tissu osseux ; (2) la perte osseuse, augmentée dans l'ostéoporose, induirait une libération de Gd.

Globalement, ces résultats suggèrent un risque accru de libération de Gd chez des patients souffrant de perte osseuse.

De plus, une **dissociation *in vivo*** de ces deux **CGs linéaires**, avec **libération de Gd^{3+} dissocié et soluble**, a été montrée, contrairement aux CGs macrocycliques, qui ont une meilleure stabilité cinétique et qui n'ont induit aucun effet toxique dans nos conditions expérimentales.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de la FSN, il était nécessaire de disposer d'un modèle permettant à la fois l'induction par le gadodiamide de lésions de fibrose et, d'autre part, qui ne soit pas associé à une toxicité systémique. Le modèle d'insuffisance rénale modérée par ajout d'adénine dans l'alimentation nous semblait idéal. Toutefois, nous avons observé, dans des études ultérieures sur ce **modèle d'insuffisance rénale modérée**, une **variabilité inter-individuelle** importante et une **amélioration de la fonction rénale** au cours du temps susceptible d'interférer avec nos résultats. Nous avons donc mis au point un autre modèle de FSN, associé à une **variabilité inter-individuelle plus faible** et une **réponse plus homogène** aux plans chronologique et de l'intensité des effets cliniques. Pour cela, les animaux ont reçu une alimentation enrichie en **adénine pendant une semaine**

supplémentaire après la fin des injections, afin d'obtenir une **insuffisance rénale sévère et durable** tout au long de l'étude.

Sur ce nouveau modèle, nous avons étudié le **rôle de l'insuffisance rénale** (en incluant un lot témoin de rats non insuffisants rénaux mais ayant reçu le gadodiamide), les effets de **l'hyperosmolalité** (en incluant un lot témoin traité par un soluté de NaCl ajusté à l'osmolalité de la solution pharmaceutique d'acide gadotérique, la plus forte des deux produits étudiés), l'influence de la **structure du CG** (en testant deux CGs : un agent macrocyclique : acide gadotérique et un agent linéaire : gadodiamide), et, enfin, nous avons comparé les paramètres hématologiques, biochimiques et analytiques des rats ayant présenté des **lésions cutanées macroscopiques** à ceux des rats **n'en ayant pas présenté**.

Afin de suivre l'évolution clinique des animaux, un **score** regroupant différents critères cliniques a été établi. Chez l'Homme, seule la mise en regard des données cliniques et histopathologiques permet le diagnostic de cette pathologie (Girardi et coll., 2011). Dans notre système de score, seuls les paramètres cliniques sont pris en compte. Ce système permet de classer les animaux en fonction de différents critères cliniques (type, nombre, forme, localisation des lésions cutanées ; repousse et aspect du poil ; présence ou non d'un pli cutané). Seuls les rats rendus **insuffisants rénaux et ayant reçu du gadodiamide** ont présenté une **élévation importante de ce score**, principalement en raison de l'apparition de lésions cutanées macroscopiques. En revanche, aucune lésion cutanée histologique n'a été mise en évidence chez les rats des autres groupes insuffisants rénaux (ayant reçu soit du NaCl 0,9%, du NaCl hyperosmolaire ou enfin l'acide gadotérique) et chez les rats non insuffisants rénaux ayant reçu le gadodiamide. Par ailleurs, des ulcérations épidermiques, de l'inflammation et de la fibrose du derme ont été notées seulement chez les rats ayant développés des lésions cutanées macroscopiques, donc uniquement chez les rats insuffisants rénaux ayant reçu le gadodiamide. Ces résultats confirment **l'importance de l'insuffisance rénale** dans les effets profibrosants du gadodiamide. Dans une étude ultérieure utilisant le même modèle, nous avons mis en évidence une corrélation significative entre la créatinémie et le score clinique et donc l'intensité et le nombre des lésions cutanées macroscopiques. De plus, **l'hyperphosphatémie** observée à la fin du régime enrichi en adénine est **corrélée au score clinique**. Or, nous avons préalablement démontré l'effet sensibilisant de l'hyperphosphatémie chez des rats insuffisants rénaux ayant reçu le gadodiamide (Fretellier et coll., 2012). Nous proposons donc que l'hyperphosphatémie associée à l'insuffisance rénale favorise la dissociation du gadodiamide puis la survenue de lésions cutanées.

Par ailleurs, nos données montrent une **rétenion de Gd plus importante** dans la peau des **rats insuffisants rénaux** ayant reçu le **gadodiamide** par rapport aux rats non insuffisants rénaux. De plus, la **concentration de Gd** dans la peau est d'autant **plus importante** que la **fonction rénale est réduite**. Ces données sont cohérentes avec d'autres études réalisées

chez le Rat démontrant l'influence de la fonction rénale (Haylor et coll., 2010 ; Pietsch et coll., 2009a). Donc, l'insuffisance rénale provoque, logiquement, la rétention des CGs dans l'organisme. Nos données nous permettent également de démontrer un **lien** entre la **concentration de gadolinium total** présente dans la peau et **l'intensité et le nombre des lésions cutanées** (notre score clinique). En effet, les rats n'ayant pas présenté de lésions cutanées (ou très peu) présentaient une concentration de gadolinium total dans la peau inférieure à celle mesurée chez les animaux en ayant développé, et quasiment équivalente à celle mesurée dans la peau des rats ayant reçu le CG macrocyclique, l'acide gadotérique. Ce lien entre la concentration de Gd total dans la peau et la présence de lésions cutanées a déjà été suggéré par Pietsch et coll., 2009a. De même, chez l'Homme, une relation entre la présence de gadolinium et les zones cutanées lésées a été établi chez des patients souffrant de FSN (Christensen et coll., 2011 ; High et coll., 2010). Toutes ces données sont cohérentes avec l'hypothèse **d'un lien entre la présence de Gd et les lésions cutanées**. Il est ainsi possible de déterminer un seuil approximatif de concentration de Gd total dans la peau pour lequel, il y aurait un risque de développer des lésions cutanées macroscopiques et de fibrose (autour de 150 nmol/g, dans nos conditions).

D'autre part, à fonction rénale équivalente, la **rétention de gadolinium** est plus importante chez le groupe ayant reçu du **gadodiamide** que dans celui ayant reçu de l'acide gadotérique. Par conséquent, la fonction rénale n'est pas le seul paramètre influant sur la rétention de gadolinium dans la peau. En effet, la **structure des CGs** joue également un rôle important, comme nous avons pu l'observer dans nos précédentes études. Donc, ce que nous dosons comme Gd total est probablement dissocié, car le profil d'excrétion des CGs est similaire. De plus, une augmentation de la relaxivité, suggérant une **dissociation *in vivo***, a été observée uniquement dans la peau des rats ayant reçu le **gadodiamide**.

Un autre objectif de cette étude était la documentation des effets de l'**hyperosmolalité** sur la fonction rénale et les paramètres biochimiques et hématologiques chez des animaux insuffisants rénaux. **Aucun effet** statistiquement significatif n'a été observé sur ces paramètres en comparant les groupes NaCl 0,9% et NaCl hyperosmolaire. L'osmolalité des CGs, en particulier celle de l'acide gadotérique (1350 mOsm/kg H₂O), la plus élevée des deux CG utilisés dans notre étude, n'a pas modifié la fonction rénale et les autres paramètres mesurés, dans nos conditions expérimentales et sur la base de la créatininémie. Par conséquent, notre étude a permis de montrer que l'hyperosmolalité des CGs n'est pas responsable de la toxicité chronique des CGs aux doses administrées dans notre étude.

Par conséquent, l'ajout d'adénine à l'alimentation des rats induit une **altération de la fonction rénale** et l'apparition d'une **hyperphosphatémie** tardive consécutive à la diminution de la fonction rénale. Lors de l'administration d'un CG, la **rétention de Gd** dans la peau augmente **selon le type** de CG et donc de sa stabilité (plus importante pour un CG linéaire non ionique dont la stabilité est inférieure, qu'avec un CG macrocyclique ionique,

plus stable) et en fonction de la **fonction rénale** (rétention plus importante en cas d'insuffisance rénale). Ces trois paramètres semblent liés à **l'apparition de lésions cutanées**. La **fonction rénale** a donc un rôle décisif, ce qui est cohérent avec notre étude précédente (Fretellier et coll., 2013), la littérature (Grant et coll., 2009 ; Haylor et coll., 2012 ; Pietsch et coll., 2009a), et les résultats cliniques.

De plus, seuls les rats ayant reçu à la fois une alimentation enrichie en **adénine** et du **gadodiamide** ont présenté des **lésions cutanées**. Par ailleurs, une **dissociation *in vivo*** n'a été observée uniquement avec ce CG. La **structure moléculaire** du CG et sa stabilité thermodynamique et cinétique ont donc un rôle décisif dans l'apparition des lésions.

Au total, nos travaux suggèrent un lien causal du Gd^{3+} dissocié à partir d'un CG peu stable et les lésions de fibrose observées chez les animaux ayant reçu cet agent, ce qui souligne **l'importance de la stabilité des CGs**.

Des **complexes de faible stabilité (le ligand étant le DTPA-BMA) d'autres lanthanides** (praséodyme, Pr ; europium, Eu ; gadolinium, Gd ; holmium, Ho) induisent des **lésions cutanées macroscopiques** et de **fibrose** chez le Rat (Pietsch et coll., 2011b). Tout d'abord, par la technique de CLHP-SM, la stabilité de ces complexes a été comparée dans du sérum humain à 37°C pendant 15 jours. Le DTPA-BMA-Pr est le complexe de lanthanide le moins stable, suivi du DTPA-BMA-Eu, du DTPA-BMA-Gd (c'est-à-dire le gadodiamide) et enfin, du DTPA-BMA-Ho. Après administration chez le Rat, le DTPA-BMA-Pr s'est avéré très toxique (mortalité importante précoce après les administrations). Le DTPA-BMA-Eu et le DTPA-BMA-Gd ont induit des lésions cutanées macroscopiques rapidement après la fin des administrations avec la même intensité et chez tous les animaux. Le DTPA-BMA-Ho a induit des lésions cutanées macroscopiques mais de façon retardée et moins intense. Les concentrations de lanthanide total (mesurées par SM) dans la peau sont d'autant plus importantes que la stabilité des complexes de Ln est faible. Ainsi, ces résultats montrent que **d'autres lanthanides** peuvent induire des **lésions ressemblant à la FSN** chez le Rat, ce qui est cohérent avec les études *in vitro* démontrant un **effet profibrosant** d'autres lanthanides que le Gd (Jenkins et coll., 2011). De plus, la **rétention tissulaire de Ln** et **l'intensité** des lésions sont liées à la **stabilité cinétique de ces complexes**, ce qui est cohérent avec nos données. En revanche, aucune toxicité n'a été observée après administration de caldiamide (DTPA-BMA-Ca), ce qui, là aussi, confirme nos résultats.

Il convient de préciser que les **lésions cutanées macroscopiques** induites par le gadodiamide ou d'autres lanthanides observées **chez les animaux** (ulcérations et croûtes) sont **très différentes** de celles décrites chez les **patients souffrant de FSN** (papules, nodules, plaques brunâtres, aspect en « peau d'orange » etc.). En revanche, les **lésions histologiques du derme** observées chez les animaux sont **similaires** aux observations effectuées chez **l'Homme** (désorganisation du collagène, hypercellularité, augmentation du collagène). De plus, l'analyse immunohistochimique est également concordante (cellules positives pour TGF β et TIMP-1), excepté l'immunomarquage CD34. En effet, dans nos conditions, tous les

fibroblastes normaux dermiques chez le Rat sont positifs pour ce marqueur, contrairement à ce qui est observé chez l'Homme. Dans la peau humaine, un immunomarquage CD34 positif est uniquement observé dans les cellules endothéliales vasculaires, des cellules fusiformes dendritiques (Nickoloff, 1991), et dans des tumeurs cutanées (Cohen et coll., 1997). Ainsi, la présence de cellules CD34 positives dans la peau humaine traduit très probablement **l'infiltration de cellules issues de la moelle osseuse (fibrocytes circulants)**. Ils pourraient ainsi s'accumuler au niveau de la peau et par conséquent, produire une quantité importante de collagène et induire une fibrose (Bucala, 2008).

Par ailleurs, les **cellules circulantes** dérivées de la **moelle osseuse** et du **stress oxydant** (*via* la NADPH oxydase, Nox4) interviennent dans la fibrose induite par le gadodiamide (Wagner et coll., 2012).

Le SAP (« serum amyloid P ») est un inhibiteur clef de la différenciation des fibrocytes. Le gadodiamide diminue la capacité du SAP à bloquer la différenciation de cellules mononucléées du sang périphérique en fibrocytes circulants (Vakil coll., 2009).

Ainsi, il nous semble important de s'intéresser **plus particulièrement aux lésions histologiques** du derme chez le Rat, même si les lésions macroscopiques sont fréquemment corrélées aux lésions histologiques (**Figure 117**). En effet, les lésions histologiques (inflammation, fibrose) et la surexpression de TGF β sont, en général, d'autant plus intenses que les lésions cutanées macroscopiques sont sévères chez des animaux ayant reçu le gadodiamide. Pour certains animaux, des lésions histologiques ont été notées alors qu'aucune lésion macroscopique n'a été détectée. Un cas de lésions infracliniques chez un patient insuffisant rénal ayant reçu du gadodiamide a été décrit (Boyd et coll., 2010).

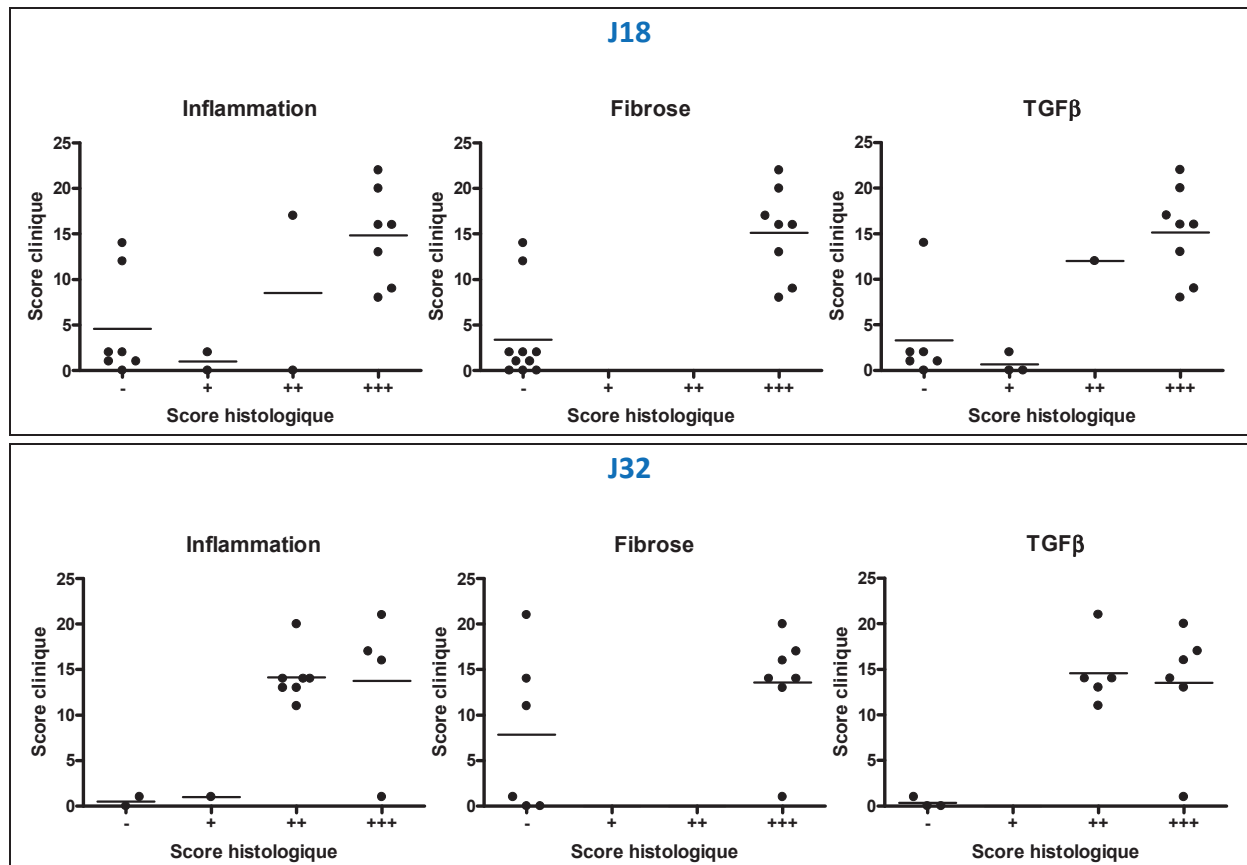


Figure 117 : Score semi-quantitatif des lésions histologiques (inflammation, fibrose) et de l'expression dermique de TGFβ en fonction du score clinique déterminé chez des rats insuffisants rénaux ayant reçu le gadodiamide à deux délais d'évaluation (J18 et J32).

NB : quatre rats avec des lésions cutanées importantes (score élevé) sont morts entre J18 et J32.

7.6 Implication de la voie de signalisation de TGFβ dans la fibrose induite par le gadodiamide

Nous avons recherché, par immunohistochimie, l'expression dermique de 3 cytokines profibrosantes impliquées dans la physiopathologie des fibroses : TGFβ, CTGF et PDGF, chez des rats insuffisants rénaux ayant reçu le gadodiamide.

La surexpression du marqueur central de la fibrose, **TGFβ**, a été observée chez les rats ayant reçu le gadodiamide ou le gadodiamide non formulé. Une surexpression de TGFβ ou de son ARN messager **chez des patients souffrant de FSN** a déjà été montrée dans des études cliniques, par immunohistochimie (Kelly et coll., 2008 ; Schieren et coll., 2010), hybridation *in situ* (Jiménez et coll., 2004) ou par RT-PCR (Schieren et coll., 2010). De plus, l'implication de la voie canonique de TGFβ, et notamment une surexpression de P-SMAD 2 et P-SMAD 3, a également été suggérée (Kelly et coll., 2008 ; Schieren et coll., 2010).

Par ailleurs, nous avons également montré la surexpression de deux autres cytokines profibrosantes : **CTGF** et **PDGF**, de manière parallèle à l'expression de TGFβ.

Une augmentation de l'expression dermique de **CTGF** a été notée chez les sujets souffrant de FSN, en comparaison avec des sujets hémodialysés sans FSN, même si la surexpression de ce marqueur était faible par rapport aux témoins non insuffisants rénaux (Schieren et coll., 2010). Par ailleurs, il a été récemment montré, *in vitro*, un rôle régulateur de CCN3 (nommé également NOV), un inhibiteur de CTGF, dans les effets profibrosants du gadodiamide (Riser et coll., 2012).

L'implication de la cytokine **PDGF** dans la FSN a également été proposée dans des études cliniques où un effet favorable de l'imatinib, un inhibiteur non sélectif de nombreuses tyrosine kinases, dont celle associée au récepteur du PDGF, a été observé (Chandran et coll., 2009 ; Elmholdt et coll., 2011a et 2011b ; Kay et High 2008). Chez le Rat, l'administration d'imatinib a permis de réduire l'hypercellularité du derme induite par le gadodiamide (Hope et coll., 2013). Par ailleurs, un inhibiteur sélectif de PDGFR/Flt-3, ARRY-768, a permis de bloquer de manière préventive et curative la fibrose et les lésions cutanées macroscopiques, induites par le gadodiamide non formulé chez le Rat, comme le fait l'imatinib (Cox et coll., 2010). Dans des études *in vitro*, le blocage du récepteur du PDGF (PDGF-R) par un anticorps inhibe les effets prolifératifs du gadodiamide mais aussi ceux du Gd « libre » soluble (Bhagavathula et coll., 2010) ; en revanche, PDGF-R ne semble pas impliqué dans les effets prolifératifs du Gd insoluble (Bleavins et coll., 2012). Dans cette étude, le blocage de TGF β n'a pas été étudié.

Nous avons souhaité étudier plus spécifiquement **l'implication de la voie de TGF β** , chez des rats traités par le gadodiamide afin de mieux comprendre le mécanisme profibrosant de ce CG. Nous avons choisi ce marqueur car il est la « **pierre angulaire** » de la fibrose. En effet, il est surexprimé dans la plupart des fibroses. Il agit par l'intermédiaire de plusieurs voies indépendantes de signalisation, la voie principale étant celle impliquant les protéines SMADs. Après activation, cette cytokine permet la synthèse et l'expression des protéines de la MEC, et notamment le collagène de type I, en inhibant sa dégradation (par l'intermédiaire de TIMP-1) et en induisant la prolifération des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes (Verrecchia et Mauviel, 2007). De plus, TGF β interagit avec de nombreuses autres voies de signalisation (telles que CTGF, PDGF ou PPAR γ). Cette cible thérapeutique fait l'objet de nombreux travaux que ce soit dans la physiopathologie de la fibrose ou dans celle de plusieurs cancers (Akhurst et Hata, 2012).

Nous avons choisi de bloquer la voie de signalisation de cette cytokine pro-fibrosante par une **approche pharmacologique curative** , en choisissant un médicament déjà commercialisé, qui possède des **propriétés anti-TGF β** à faible dose, **le paclitaxel** . En effet, il peut inhiber la phosphorylation des protéines SMAD 2 et SMAD 3, toutes deux impliquées dans **la voie canonique du TGF β** (Zhou et coll., 2010).

D'autres possibilités d'étude de cette voie étaient envisageables, comme l'invalidation du gène codant pour cette cytokine, ou l'utilisation d'anticorps anti-TGF β . Néanmoins, comme nous l'avons mentionné précédemment, nous pensons qu'il est préférable de ne pas inhiber directement le TGF β car il possède de nombreuses autres fonctions physiologiques.

Dans une première étude, nous avons montré que le **paclitaxel réduit fortement et rapidement les lésions macroscopiques, les lésions de fibrose** et l'expression de **TGF β** et de **P-SMAD 3** chez les rats ayant reçu le gadodiamide et dont **l'insuffisance rénale était modérée**. Ces résultats suggèrent ainsi qu'il est possible de bloquer et de traiter la fibrose induite par le gadodiamide chez des rats insuffisants rénaux, en inhibant la voie de signalisation de TGF β . Nous avons ainsi suggéré **l'implication de la voie canonique du TGF β** dans la fibrose induite par le gadodiamide. Toutefois, nous ne pouvons pas conclure en ce qui concerne la numération cellulaire dans le derme car nous avons probablement évalué ce paramètre à un délai trop tardif, qui n'est plus discriminant. Avant le début du traitement par le paclitaxel ou le DMSO, une hypercellularité a été notée chez tous les animaux ayant reçu le gadodiamide, ce qui était attendu (Haylor et coll., 2010). En revanche, à la fin de l'étude et donc après l'arrêt du régime enrichi en adénine, la cellularité mesurée dans le derme est revenue à une valeur proche des valeurs prétraitements. Or, l'hypercellularité du derme est d'autant plus importante que l'insuffisance rénale est sévère après administration de gadodiamide chez le Rat (Haylor et coll. 2010).

De plus, peu d'animaux ont présenté des lésions à la fois macroscopiques et microscopiques et les lésions ne sont pas apparues aux mêmes délais (**variabilité inter-individuelle importante**). Une hétérogénéité du nombre de rats avec des lésions histologiques dans les deux groupes ayant reçu le gadodiamide a aussi été notée. En effet, avant le début des traitements, la répartition du nombre d'animaux avec des lésions cutanées entre le groupe gadodiamide et DMSO et le groupe ayant reçu le paclitaxel était équivalente (respectivement, 5 rats sur 12 et 7 rats sur 15). En revanche, le nombre de rats présentant une fibrose du derme et/ou une inflammation était nettement supérieur dans le groupe ayant reçu du gadodiamide et du paclitaxel que celui ayant reçu du DMSO (respectivement, 2 rats sur 12 et 6 rats sur 15).

Les lésions macroscopiques ont régressé spontanément mais tardivement chez certains animaux n'ayant pas reçu le paclitaxel, même si la disparition des lésions a été beaucoup plus rapide après traitement avec le paclitaxel.

Par ailleurs, nous avons observé une **amélioration de la fonction rénale** dès l'arrêt du régime enrichi en adénine, ce qui n'est pas cohérent avec la clinique et peut interférer avec nos résultats. L'amélioration tardive de la fonction rénale pourrait expliquer la diminution de la cellularité du derme et l'amélioration spontanée des lésions cutanées macroscopiques observées tardivement chez les rats ayant reçu du gadodiamide et le DMSO. En effet, l'amélioration de la fonction rénale peut ralentir, voire même inverser, l'évolution naturelle de la FSN chez les patients (Cowper, 2007).

Le **degré de l'insuffisance rénale** et sa **réversibilité** sont donc des paramètres importants qui influent sur le degré d'intensité des lésions et leur délai d'apparition. Par conséquent, nous avons réalisé une seconde étude sur un modèle d'insuffisance rénale plus sévère et stable tout au long de l'étude. Ce modèle était associé à une plus faible variabilité inter-individuelle et une réponse clinique plus homogène quant à la chronologie des effets et à leur intensité. Sur ce second modèle, le **paclitaxel n'a pas présenté d'effet thérapeutique**. En effet, nous n'avons observé aucune amélioration des lésions cutanées macroscopiques et histologiques. Ces résultats suggèrent donc que les lésions de fibrose sont peut-être trop importantes et/ou que la fibrose est à un stade irréversible.

La question de la **réversibilité de la fibrose** reste largement débattue et la réversibilité semble dépendre du tissu concerné et de l'état d'avancement de la fibrose (Wynn, 2008). De nombreuses études animales ont mis en évidence, sur des modèles distincts, la réversibilité de la fibrose installée (Chatziantoniou et coll., 2008 ; Ramachandran et Iredale 2009). De plus, une réversibilité de la fibrose a parfois été montrée chez l'Homme (Bonis et coll., 2001 ; Desmet et Roskams 2004 ; Fioretto et coll., 1998 ; Fioretto et coll., 2006). Cependant, malgré ces résultats prometteurs, la réversibilité de la fibrose n'est pas systématique et est souvent difficile, comme nous l'avons observé dans notre étude. Il est aussi probable qu'en inhibant ou en stimulant une seule voie de signalisation sur le long terme, un phénomène d'échappement peut se produire, comme cela est fréquemment observé dans les protocoles de chimiothérapie anti-cancéreuse (Van Amerongen et coll., 2008). Tout ceci justifie les travaux ayant pour but d'élucider les différents acteurs mis en jeu dans le mécanisme des fibroses afin de permettre d'identifier de nouvelles stratégies et cibles thérapeutiques.

7.7 Hypothèse de mécanisme de la fibrose systémique néphrogénique

Tous les patients atteints de FSN souffrent d'insuffisance rénale sévère et terminale (Abu-Alfa, 2011). Cette spécificité a été décrite dès la découverte de la maladie (elle en est même pathognomonique). Le **niveau d'insuffisance rénale** a un **rôle décisif**. La toxicité systémique des CGs peu stables, la rétention tissulaire de Gd et les lésions de fibrose sont d'autant plus importantes que l'insuffisance rénale est sévère chez le Rat. Ces résultats sont cliniquement pertinents et cohérents avec la littérature (Grant et coll., 2009 ; Haylor et coll., 2012 ; Pietsch et coll., 2009a). Par ailleurs, il a été suggéré que le rein puisse synthétiser un marqueur protecteur de la fibrose. Par exemple, la protéine transmembranaire **Klotho**, qui est fortement exprimée dans les tubules rénaux, présente des propriétés **anti-fibrosantes**. Elle bloque la voie de signalisation de TGF β et diminue l'expression d' α SMA et du procollagène I (Doi et coll., 2011) (voir section 1.4.4.3). Or, **en cas d'insuffisance rénale**, son expression est nettement **diminuée**. Après transplantation rénale et donc le rétablissement de Klotho, une amélioration des symptômes de la FSN apparaît, ces effets pourraient donc être dus aux propriétés anti-fibrosantes de cette hormone (Swaminathan, 2011 ; Wollanka et coll., 2009).

Nos travaux montrent la **décomplexation de deux CGs linéaires**, présentant une **faible stabilité**, *in vitro* dans du sérum et *in vivo* sur différents modèles d'insuffisance rénale. Une libération progressive de Gd^{3+} sous forme **soluble** a été démontrée. Nos résultats et ceux de la littérature suggèrent une interaction entre l'ion Gd^{3+} dissocié à partir du gadodiamide, le CG le moins stable des CGs étudiés, et les protéines sériques.

Le Gd^{3+} « libre » ainsi que d'autres lanthanides ont des propriétés prolifératives *in vitro* sur des fibroblastes en culture. Des lésions cutanées macroscopiques et des lésions de fibroses semblables à la FSN ont été observées uniquement après administration du CG le moins stable, le gadodiamide, et principalement lorsqu'il n'est pas formulé avec un excès de ligand, et après administration de complexes de lanthanides peu stables, ce qui souligne **l'importance de la stabilité et un effet lié à la famille chimique**. Ces données suggèrent ainsi fortement un **lien causal avec la présence de Gd^{3+} dissocié**. Néanmoins, ce lien n'est pas formellement établi, même s'il est largement suspecté (Morcos, 2007 ; Perazella, 2008). Il est donc nécessaire d'effectuer des études complémentaires. Nous réalisons actuellement une étude visant à évaluer la possibilité d'un effet profibrosant d'un sel soluble de Gd chez le Rat rendu insuffisant rénal (modèle sévère et stable), afin d'étudier la possibilité d'un effet causal de ce métal dans la survenue de la FSN.

Il reste également à savoir **à quelle(s) molécule(s)** se lie le Gd^{3+} dissocié afin de mieux comprendre ses effets.

A ce jour, nous ne savons pas si la dissociation a lieu dans le compartiment intra- ou extracellulaire. Du Gd^{3+} dissocié a été retrouvé à l'intérieur de cellules (Cabella et coll., 2006 ; Haylor et coll., 2012 ; Thakral et Abraham, 2009) mais également au niveau extracellulaire (Haylor et coll., 2012 ; Sanyal et coll., 2011).

Par ailleurs, le **phosphate** semble jouer un rôle important. Il permet d'accélérer la libération de Gd^{3+} à partir des CGs linéaires. Il permet également de sensibiliser des rats insuffisants rénaux aux effets profibrosants du gadodiamide. De plus, des dépôts insolubles de Gd associé à du phosphate ont été détectés dans la peau de patients souffrant de FSN (Boyd et coll., 2007 ; George et coll., 2010 ; Sanyal et coll., 2011).

D'autres études suggèrent que la libération de Gd^{3+} pourrait être la conséquence d'une **transmétallation** entre le Gd et le **zinc** par exemple. En effet, le zinc semble catalyser la dissociation des CGs peu stables *in vitro* (Laurent et coll., 2001 et 2010 ; Robic et coll., 2011 ; Taupitz et coll., 2013). Néanmoins, la stabilité thermodynamique de DTPA-BMA-Zn est moins favorable que celle du DTPA-BMA-Gd ($\log K_{cond}$: 10,1 et 14,9 respectivement) (Port et coll., 2008).

Par ailleurs, certains auteurs suggèrent une augmentation de la concentration de zinc dans certains organes (foie, os...) chez des patients dialysés (D'Haese et coll., 1999 ; Smythe et coll., 1982). En revanche une diminution de la concentration sérique de zinc a été notée (D'Haese et Broe, 1996).

En 1993, lors des études précliniques de toxicité subchronique effectuées sur le gadodiamide, des lésions cutanées chez le Rat sont apparues après administration de forte dose de gadodiamide et ont été attribuées à une déplétion en zinc (Harpur et coll., 1993). Néanmoins, les résultats d'une étude récente effectuée chez le Rat (rôle d'un déficit et d'une supplémentation de zinc) ne sont pas cohérents avec cette hypothèse (Pietsch et coll., 2009b).

D'autres auteurs suggèrent une **transmétallation** avec le **fer**. En effet, la constante thermodynamique du DTPA-BMA-Fe est plus favorable que celle du DTPA-BMA-Gd (log K_{therm} : 21,9 et 16,9 respectivement), favorisant ainsi une transmétallation. Swaminathan et coll. (2007) ont observé chez deux patients, ayant reçu du gadodiamide et développé une FSN, une augmentation de la mobilisation du fer (sur-saturation de la transferrine, augmentation des concentrations du fer libre et de la ferritine sérique). Néanmoins, le fer est peu présent à l'état libre ionisé car il peut induire la formation de radicaux libres toxiques, par l'intermédiaire de la réaction de Fenton (Wardman et Candeias, 1996).

Chez le Rat, l'administration concomitante **d'EPO** (EPO alpha) **et de fer** (fer dextran) **sensibilise** des animaux (naïfs, non insuffisants rénaux) aux effets profibrosants du gadodiamide (Hope et coll., 2009). Nous réalisons actuellement une étude afin d'étudier plus spécifiquement l'influence du type de fer (de stabilités différentes) utilisé sur le développement de la FSN et la transmétallation entre le gadolinium et le fer. Par ailleurs, l'administration d'un chélateur oral du fer chez le Rat insuffisant rénal prévient la fibrose cutanée induite par le gadodiamide (Swaminathan, 2012) (communication personnelle).

L'**EPO**, quant à elle, peut augmenter l'expression de la chimiokine MCP-1 et peut permettre le recrutement des fibrocytes circulants issus de la moelle osseuse et potentialiser leur activité (Haroon et coll., 2003 ; Santhanam et coll., 2008). Néanmoins, la résistance à l'EPO observée chez certains patients souffrant de FSN pourrait être la conséquence d'un état pro-inflammatoire, également mis en évidence chez les patients (Idée et coll., 2008).

Après administration d'un CG peu stable, des lésions de fibrose ressemblant à la FSN apparaissent chez des rats insuffisants rénaux. Nous avons démontré **l'implication de la voie canonique de TGF β** dans cette fibrose et la surexpression d'autres cytokines profibrosantes, CTGF et PDGF. D'autres auteurs ont montré l'implication de fibrocytes circulants CD34+ (Vakil et coll., 2009 ; Wagner et coll., 2012).

Certains auteurs évoquent un effet immédiat du Gd car une libération rapide et transitoire de cytokines proinflammatoires et profibrosantes est observée 6 heures après administration de gadodiamide ou de gadodiamide non formulé. Ces cytokines libérées pourraient ainsi initier la fibrose (Pietsch et coll., 2011b ; Steger-Hartmann et coll., 2009). Nos données ne sont pas cohérentes avec cette hypothèse. En effet, nous observons une dissociation progressive des CGs peu stables avec une libération de Gd³⁺ dissocié à partir, probablement, d'un compartiment de réserve (« profond ») du Gd. De plus, dans nos études,

la surexpression dermique de TGF β , acteur clef de la fibrose, et de marqueurs d'inflammations n'est jamais transitoire.

On peut enfin s'interroger sur les conséquences d'une décomplexation des CGs peu stables à une plus grande échelle. En effet, la présence, à des concentrations non négligeables, de Gd dans les eaux usées a été montrée en Allemagne (Künne Meyer et coll., 2009). Or, leur traitement comporte l'utilisation de sels de fer comme agent flocculant afin de précipiter le phosphate, il existe donc un risque théorique de transmétallation et de libération de Gd³⁺ dissocié.

Par ailleurs, le cas de l'implication des CGs peu stables dans la survenue d'une pathologie fibrosante n'est pas isolé. En effet, certains agents (tels que la carbidopa, le L-tryptophane, la bléomycine ou des dérivés de l'aniline, nommés « syndrome de l'huile espagnole frelatée », etc.) ont pu, dans le passé, présenter un effet similaire (Boin et Hummers, 2008 ; Thakral et Abraham, 2009).

En résumé, nos travaux sont en faveur **d'un effet profibrosant du Gd³⁺ dissocié** consécutif à la **décomplexation progressive des CGs peu stables**. En effet, nous avons montré la présence de Gd³⁺ sous forme soluble, probablement associé à des protéines, dans les tissus de rats ayant reçu des CGs peu stables. Néanmoins, d'autres formes de Gd peuvent être également présentes, notamment des dépôts insolubles, comme observés dans des biopsies humaines.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein du centre de Recherche du laboratoire Guerbet. Ces travaux ont fait l'objet de quatre articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture ainsi que d'une présentation orale invitée dans un symposium international dédié au mécanisme de la fibrose systémique néphrogénique. Quatre stagiaires ont participé à ces différents travaux et nous avons eu plaisir à les encadrer.

CONCLUSION

Nos résultats, mis en perspective avec les travaux de nombreux auteurs, nous permettent de formuler l'hypothèse qui apparaît dans la **Figure 118**. La libération progressive de **Gd³⁺ dissocié** à partir des CGs peu stables serait responsable des **effets profibrosants** de ces complexes observés chez des patients en insuffisance rénale sévère. Le **degré de l'insuffisance rénale** est un paramètre crucial. Une insuffisance rénale importante permet une exposition prolongée au CG et induit une **hyperphosphatémie**, due à la diminution de l'excrétion rénale du phosphate. Nous posons donc l'hypothèse que l'hyperphosphatémie induit une accélération de la libération de Gd³⁺ dissocié profibrosant et sensibilise ainsi aux effets d'un CG peu stable. Cette dissociation des CGs peu stables pourrait être favorisée par un métal endogène (tel que le zinc ou le fer) avec lequel surviendrait une **transmétallation**. Le Gd³⁺ ainsi dissocié pourrait stimuler la **prolifération** des fibroblastes, activer la **synthèse de collagène** et en inhiber la dégradation, par l'intermédiaire de nombreux médiateurs profibrosants (tels que PDGF, TGFβ, CTGF, TIMP-1), ce qui conduirait à **l'accumulation de collagène**, **l'hypercellularité du derme** et, par conséquent, à la **fibrose**.

Nos travaux sont donc en faveur de l'hypothèse mécanistique d'une **dissociation des CGs peu stables** et soulignent ainsi **l'importance de la stabilité** des CGs. Nos modèles sensibilisés et cliniquement pertinent peuvent également permettre le criblage préclinique de nouveaux CGs.

Il semble que la maladie ait quasiment disparu après la mise en place des mesures de précaution par les autorités de santé et notamment la recommandation d'utilisation de CGs macrocycliques chez l'insuffisant rénal. Néanmoins, des travaux sont nécessaires afin de répondre aux questions encore non résolues et par conséquent, améliorer la prise en charge des patients souffrant de FSN.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Xu SW, du Bois RM, Black CM. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol.* 1997; 151: 831-841.

Abraham JL, Thakral C, Skov L, Rossen K, Marckmann P. Dermal inorganic gadolinium concentrations: evidence for in vivo transmetallation and long-term persistence in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol.* 2008; 158: 273-280.

Abraham JL, Thakral C. Tissue distribution and kinetics of gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis. *Eur J Radiol.* 2008; 66: 200-207.

Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol.* 2002; 4: 599-604.

Abu-Alfa AK. Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium-based contrast agents. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2011; 18: 188-198.

Abujudeh HH, Kaewlai R, Kagan A, Chibnik LB, Nazarian RM, High WA, Kay J. Nephrogenic systemic fibrosis after gadopentetate dimeglumine exposure: case series of 36 patients. *Radiology.* 2009; 253: 81-89.

Agarwal R, Brunelli SM, Williams K, Mitchell MD, Feldman HI, Umscheid CA. Gadolinium-based contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24: 856-863.

Ahmad S. Association of metoprolol and retroperitoneal fibrosis. *Am Heart J.* 1996; 131: 202-203.

Aime S, Caravan P. Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J Magn Reson Imaging.* 2009; 30: 1259-1267.

Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11: 790-811.

Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Busch N, Zwerina J, Schett G, Distler O, Distler JH. Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 219-224.

Albaaj F, Hutchison A. Hyperphosphataemia in renal failure: causes, consequences and current management. *Drugs.* 2003; 63: 577-596.

American College of Radiology. Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF). 2012. Disponible à : <http://www.acr.org/~media/ACR/Documents/PDF/QualitySafety/Resources/Contrast%20Manual/Nephrogenic%20Systemic%20Fibrosis.pdf>

Amet S, Deray G. Toxicité rénale des produits de contraste chez le patient oncologique. *Bulletin du cancer.* 2012 ; 99 : 295-307.

Amet S, Clément O, Frances C, Tricotel A, Stengel B, Gauvrit JY, Grenier N, Reinhardt G, Janus N, Rouillon L, Choukroun G, Laville M, Deray G, Launay-Vacher V. Étude prospective sur la fibrose néphrogénique systémique après administration de produits de contraste chez les patients hémodialysés : résultats de l'étude Pro-Finest. *J Pharm Clin* 2012; 31: 149-158.

Aoki Y, Maeno T, Aoyagi K, Ueno M, Aoki F, Aoki N, Nakagawa J, Sando Y, Shimizu Y, Suga T, Arai M, Kurabayashi M. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, suppresses bleomycin-induced acute lung injury and fibrosis. *Respiration.* 2009; 77: 311-319.

Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Increased expression levels of integrin α v β 5 on scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol.* 2004; 164: 1275-1292.

Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Increased expression of integrin α (v) β 3 contributes to the establishment of autocrine TGF- β signaling in scleroderma fibroblasts. *J Immunol.* 2005; 175: 7708-7718.

Asano Y, Bujor AM, Trojanowska M. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* 2010; 59: 153-162.

Auron A, Shao L, Warady BA. Nephrogenic fibrosing dermopathy in children. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 1307-1311.

B

Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2010; 55: 726-741.

Bangsgaard N, Hansen JM, Marckmann P, Skov L. Nephrogenic systemic fibrosis symptoms alleviated by renal transplantation. *Dial Transplant*. 2011; 40: 86-87.

Barker-Griffith A, Goldberg J, Abraham JL. Ocular pathologic features and gadolinium deposition in nephrogenic systemic fibrosis. *Arch Ophthalmol*. 2011; 129: 661-663.

Baron PW, Cantos K, Hillebrand DJ, Hu KQ, Ojogho ON, Nehlsen-Cannarella S, Concepcion W. Nephrogenic fibrosing dermopathy after liver transplantation successfully treated with plasmapheresis. *Am J Dermatopathol*. 2003; 25: 204-209.

Basak P, Jesmajian S. Nephrogenic systemic fibrosis: current concepts. *Indian J Dermatol*. 2011; 56: 59-64.

Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Lora JM, Al-Garawi A, Solé M, Colmenero J, Nicolás JM, Jiménez W, Weich N, Gutiérrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodés J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology*. 2003; 125: 117-125.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115: 209-218.

Bea F, Blessing E, Shelley MI, Shultz JM, Rosenfeld ME. Simvastatin inhibits expression of tissue factor in advanced atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice independently of lipid lowering: potential role of simvastatin-mediated inhibition of Egr-1 expression and activation. *Atherosclerosis*. 2003; 167: 187-194.

Behets GJ, Verberckmoes SC, Oste L, Bervoets AR, Salomé M, Cox AG, Denton J, De Broe ME, D'Haese PC. Localization of lanthanum in bone of chronic renal failure rats after oral dosing with lanthanum carbonate. *Kidney Int*. 2005; 67: 1830-1836.

Bennett CL, Qureshi ZP, Sartor AO, Norris LB, Murday A, Xirasagar S, Thomsen HS. Gadolinium-induced nephrogenic systemic fibrosis: the rise and fall of an iatrogenic disease. *Clin Kidney J*. 2012; 5: 82-88.

Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002; 53: 409-435.

Betsholtz C. Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003; 69: 272-285.

Bhagavathula N, Dame MK, DaSilva M, Jenkins W, Aslam MN, Perone P, Varani J. Fibroblast response to gadolinium: role for platelet-derived growth factor receptor. *Invest Radiol*. 2010; 45: 769-777.

Bhattacharyya S, Chen SJ, Wu M, Warner-Blankenship M, Ning H, Lakos G, Mori Y, Chang E, Nihijima C, Takehara K, Feghali-Bostwick C, Varga J. Smad-independent transforming growth factor-beta regulation of early growth response-1 and sustained expression in fibrosis: implications for scleroderma. *Am J Pathol.* 2008; 173: 1085-1099.

Bhattacharyya S, Ishida W, Wu M, Wilkes M, Mori Y, Hinchcliff M, Leof E, Varga J. A non-Smad mechanism of fibroblast activation by transforming growth factor-beta via c-Abl and Egr-1: selective modulation by imatinib mesylate. *Oncogene.* 2009a; 28: 1285-1297.

Bhattacharyya S, Wei J, Melichian DS, Milbrandt J, Takehara K, Varga J. The transcriptional cofactor nab2 is induced by tgf-Beta and suppresses fibroblast activation: physiological roles and impaired expression in scleroderma. *PLoS One.* 2009b; 4: e7620.

Bhattacharyya S, Wu M, Fang F, Tourtellotte W, Feghali-Bostwick C, Varga J. Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol.* 2011a; 30: 235-242.

Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol.* 2011b; 8: 42-54.

Biagi BA, Enyeart JJ. Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am J Physiol.* 1990; 259: 515-520.

Bleavins K, Perone P, Naik M, Rehman M, Aslam MN, Dame MK, Meshinchi S, Bhagavathula N, Varani J. Stimulation of fibroblast proliferation by insoluble gadolinium salts. *Biol Trace Elem Res.* 2012; 145: 257-267.

Bloch F. Nuclear induction. *Phys Rev.* 1946; 70: 460-474.

Boehm I. Which laboratory parameters are characteristic for nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24: 2293; author reply 2293-2294.

Boffa JJ, Lu Y, Placier S, Stefanski A, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 1132-1144.

Boin F, Hummers LK. Scleroderma-like fibrosing disorders. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008; 34: 199-220.

Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med.* 2001; 344: 452–454.

Bonnemain B, Meyer D. Present Aspects of MRI Contrast Agents – Early Experience with DOTA Gadolinium. MR'85 ; internationales kernspintomographie symposium ; Garmisch Partenkirchen. 24-27 janvier 1985; 81-88.

Bonner JC, Badgett A, Lindroos PM, Osornio-Vargas AR. Transforming growth factor beta 1 downregulates the platelet-derived growth factor alpha-receptor subtype on human lung fibroblasts in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995; 13: 496-505.

Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 255-273.

Booth AJ, Csencsits-Smith K, Wood SC, Lu G, Lipson KE, Bishop DK. Connective tissue growth factor promotes fibrosis downstream of TGFbeta and IL-6 in chronic cardiac allograft rejection. *Am J Transplant.* 2010; 10: 220-230.

Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, Treptau J, Gressner AM, Weiskirchen R. Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest.* 2004; 84: 766-777.

Bourrinet P, Martel E, El Amrani AI, Champeroux P, Richard S, Fauchou N, Le Coz F, Drici M, Bonnemain B, Gaillard S. Cardiovascular safety of gadoterate meglumine (Gd-DOTA). *Invest Radiol.* 2007; 42: 63-77.

Bousquet JC, Saini S, Stark DD, Hahn PF, Nigam M, Wittenberg J, Ferrucci JT Jr. Gd-DOTA: characterization of a new paramagnetic complex. *Radiology.* 1988; 166: 693-698.

Boyd AS, Zic JA, Abraham JL. Gadolinium deposition in nephrogenic fibrosing dermopathy. *J Am Acad Dermatol.* 2007; 56: 27-30.

Boyd AS, Sanyal S, Abraham JL. Tissue gadolinium deposition and fibrosis mimicking nephrogenic systemic fibrosis (NSF)-subclinical nephrogenic systemic fibrosis? *J Am Acad Dermatol.* 2010; 62: 337-342.

Braverman IM, Cowper S. Nephrogenic systemic fibrosis. *F1000 Med Rep.* 2010; 2: 84.

Broome DR. Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: a summary of the medical literature reporting. *Eur J Radiol.* 2008; 66: 230-234.

Brown-Maher T, Nguyen K. Les mucinoses cutanées. Dermatologie Conférences Scientifiques. 2004; volume 3 numéro 1. Disponible à : www.dermatologieconferences.ca

Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. Mol Med. 1994; 1: 71-81.

Bucala R. Fibrocytes: new insights into tissue repair and systemic fibrosis. Chapter 1: Fibrocytes: discovery of a circulating connective tissue cell progenitor. 2007.

Bucala R. Circulating fibrocytes: cellular basis for NSF. J Am Coll Radiol. 2008; 5: 36-39.

Bucala R. Review Series - Inflammation & Fibrosis. Fibrocytes and fibrosis. Q J Med. 2012; 105: 505-508.

Bueso-Ramos CE, Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Rios MB, Medeiros LJ, Kantarjian H. Imatinib mesylate therapy reduces bone marrow fibrosis in patients with chronic myelogenous leukemia. Cancer. 2004; 101: 332-336.

Bussi S, Fouillet X, Morisetti A. Toxicological assessment of gadolinium release from contrast media. Exp Toxicol Pathol. 2007; 58: 323-330.

C

Cabella C, Crich SG, Corpillo D, Barge A, Ghirelli C, Bruno E, Lorusso V, Uggeri F, Aime S. Cellular labeling with Gd(III) chelates: only high thermodynamic stabilities prevent the cells acting as 'sponges' of Gd³⁺ ions. Contrast Media Mol Imaging. 2006; 1: 23-29.

Cabello-Verrugio C, Córdova G, Vial C, Zúñiga LM, Brandan E. Connective tissue growth factor induction by lysophosphatidic acid requires transactivation of transforming growth factor type β receptors and the JNK pathway. Cell Signal. 2011; 23: 449-457.

Cailloce L, Demarthon F, Testard-Valliant P. L'imagerie médicale, Radiographie d'une révolution. CNRS le journal. septembre-octobre 2011; 260-261: 2-12. Disponible à : <http://www.cnrs.fr/fr/pdf/tap/imagerie-medicale/pubData/source/IRM.pdf>

Cantley LG. Macrophages in renal injury and fibrosis. Sixth Annual Yale Fibrosis Symposium. New Haven, CT, USA. 16-17 novembre 2012. Présentation orale.

Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. J Cell Sci. 2005; 118: 1341-1353.

Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev.* 1999; 99: 2293-2352.

Castelino FV, Seiders J, Bain G, Brooks SF, King CD, Swaney JS, Lorrain DS, Chun J, Luster AD, Tager AM. Amelioration of dermal fibrosis by genetic deletion or pharmacologic antagonism of lysophosphatidic acid receptor 1 in a mouse model of scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 1405-1415.

Cavagna FM, Maggioni F, Castelli PM, Daprà M, Imperatori LG, Lorusso V, Jenkins BG. Gadolinium chelates with weak binding to serum proteins. A new class of high-efficiency, general purpose contrast agents for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol.* 1997; 32: 780-796.

Chachuat A, Molinier P, Bonnemain B, Chambon C, Gayet JL. Pharmacokinetics and tolerance of Gd-DOTA (DOTAREM) in healthy volunteers and in patients with chronic renal failure. *Eur Radiol.* 1992; 2: 326-329.

Chamberlain RM, Shirley DG. Time course of the renal functional response to partial nephrectomy: measurements in conscious rats. *Exp Physiol.* 2007; 92: 251-262.

Chandran S, Petersen J, Jacobs C, Fiorentino D, Doeden K, Lafayette RA. Imatinib in the treatment of nephrogenic systemic fibrosis. *Am J Kidney Dis.* 2009; 53: 129-132.

Chatziantoniou C, Dussaule J.C. Is kidney injury a reversible process? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008; 17: 76-81.

Chen SJ, Ning H, Ishida W, Sodin-Semrl S, Takagawa S, Mori Y, Varga J. The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *J Biol Chem.* 2006; 281: 21183-21197.

Cho SJ, Kang MJ, Homer RJ, Kang HR, Zhang X, Lee PJ, Elias JA, Lee CG. Role of early growth response-1 (Egr-1) in interleukin-13-induced inflammation and remodeling. *J Biol Chem.* 2006; 281: 8161-8168.

Chow DS, Bahrami S, Raman SS, Rotchel S, Sayre JW, Busuttill RW, Lu DS. Risk of nephrogenic systemic fibrosis in liver transplantation patients. *AJR Am J Roentgenol.* 2011; 197: 658-662.

Christensen KN, Lee CU, Hanley MM, Leung N, Moyer TP, Pittelkow MR. Quantification of gadolinium in fresh skin and serum samples from patients with nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 64: 91-96.

Chung HJ, Chung KY. Nephrogenic fibrosing dermopathy: response to high-dose intravenous immunoglobulin. *Br J Dermatol.* 2004; 150: 596-597.

Clozel M, Salloukh H. Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan. *Ann Med.* 2005; 37: 2-12.

Cohen PR, Rapini RP, Farhood AI. Dermatopathologic advances in clinical research. The expression of antibody to CD34 in mucocutaneous lesions. *off. Dermatol Clin.* 1997; 15: 159-176.

Coladonato JA. Control of hyperphosphatemia among patients with ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: S107-114.

Collidge TA, Thomson PC, Mark PB, Traynor JP, Jardine AG, Morris ST, Simpson K, Roditi GH. Gadolinium-enhanced MR imaging and nephrogenic systemic fibrosis: retrospective study of a renal replacement therapy cohort. *Radiology.* 2007; 245: 168-5. Erratum in: *Radiology.* 2010; 255: 308.

Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM Jr, Ko TC, Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 366-372.

Cordova KB, Oberg TJ, Malik M, Robinson-Bostom L. Dermatologic conditions seen in end-stage renal disease. *Semin Dial.* 2009; 22: 45-55.

Corot C, Idee JM, Hentsch AM, Santus R, Mallet C, Goulas V, Bonnemain B, Meyer D. Structure-activity relationship of macrocyclic and linear gadolinium chelates: investigation of transmetallation effect on the zinc-dependent metalloproteinase angiotensin-converting enzyme. *J Magn Reson Imaging.* 1998; 8: 695-702.

Cotton S. Lanthanides and actinides. London. Macmillan edition. 1991.

Cowper SE, Robin HS, Steinberg SM, Su LD, Gupta S, LeBoit PE. Scleromyxoedema-like cutaneous diseases in renal-dialysis patients. *Lancet.* 2000; 356: 1000-1001.

Cowper SE, Su LD, Bhawan J, Robin HS, LeBoit PE. Nephrogenic fibrosing dermopathy. *Am J Dermatopathol.* 2001; 23: 383-393.

Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: the nosological and conceptual evolution of nephrogenic fibrosing dermopathy. *Am J Kidney Dis.* 2005 Oct; 46: 763-765.

Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: a review and exploration of the role of gadolinium. *Adv Dermatol.* 2007; 23: 131-154.

Cowper SE, Rabach M, Girardi M. Clinical and histological findings in nephrogenic systemic fibrosis. *Eur J Radiol.* 2008; 66: 191-199.

Cowper SE. Nephrogenic Systemic Fibrosis [ICNSFR Website]. 2001-2009. Disponible à : <http://www.icnsfr.org>

Cox A. The array biopharma experience. Fourth Annual Symposium on Nephrogenic Systemic Fibrosis and Gadolinium-Based Contrast Agents. New York, NY, USA. 14-15 mai 2010.

Cuffy MC, Singh M, Formica R, Simmons E, Abu Alfa AK, Carlson K, Girardi M, Cowper SE, Kulkarni S. Renal transplantation for nephrogenic systemic fibrosis: a case report and review of the literature. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26: 1099-1101.

Czuwara-Ladykowska J, Shirasaki F, Jackers P, Watson DK, Trojanowska M. Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276: 20839-20848.

D

Darrah TH, Prutsman-Pfeiffer JJ, Poreda RJ, Ellen Campbell M, Hauschka PV, Hannigan RE. Incorporation of excess gadolinium into human bone from medical contrast agents. *Metallomics.* 2009; 1: 479-488.

DaSilva M, O'Brien Deming M, Fligel SE, Dame MK, Johnson KJ, Swartz RD, Varani J. Responses of human skin in organ culture and human skin fibroblasts to a gadolinium-based MRI contrast agent: comparison of skin from patients with end-stage renal disease and skin from healthy subjects. *Invest Radiol.* 2010; 45: 733-739.

Dawe RS. Ultraviolet A1 phototherapy. *Br J Dermatol.* 2003; 148: 626-637.

Dean PB, Niemi P, Kivisaari L, Korman M. Comparative pharmacokinetics of gadolinium DTPA and gadolinium chloride. *Invest Radiol.* 1988 Sep;23: S258-260.

De Angelis R, Bugatti L, Cerioni A, Del Medico P, Filosa G. Diffuse scleroderma occurring after the use of paclitaxel for ovarian cancer. *Clin Rheumatol.* 2003; 22: 49-52.

de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 ; 15: 1-11.

Deng A, Martin DB, Spillane A, Chwalek J, St Surin-Lord S, Brooks S, Petralli J, Sina B, Gaspari A, Kao G. Nephrogenic systemic fibrosis with a spectrum of clinical and histopathological presentation: a disorder of aberrant dermal remodeling. *J Cutan Pathol*. 2010; 37: 204-210.

Deo A, Fogel M, Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: a population study examining the relationship of disease development to gadolinium exposure. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; 2: 264-267.

Deray G, Bellin MF, Baumelou B, Rey JP, Boulechfar H, Grellet J, Jacobs C. Renal tolerance of the paramagnetic contrast medium Gd-DOTA in patients with chronic renal failure. *Am J Nephrol*. 1990; 10: 522-523.

Dereure O. La photothérapie UVA1 se développe. *Le journal faxé de dermatologie*. 2004. Disponible à : <http://www.regifax.fr/journaux/pdf/1/D171204.pdf>.

Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol*. 2004; 40: 860–867.

Desmoulière A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest*. 2003; 83: 1689-1707.

D'Haese PC, De Broe ME. Adequacy of dialysis: trace elements in dialysis fluids. *Nephrol Dial Transplant*. 1996; 11: 92-97.

D'Haese PC, Couttenye MM, Lamberts LV, Elseviers MM, Goodman WG, Schrooten I, Cabrera WE, De Broe ME. Aluminum, iron, lead, cadmium, copper, zinc, chromium, magnesium, strontium, and calcium content in bone of end-stage renal failure patients. *Clin Chem*. 1999; 45: 1548-1556.

DiCarlo JB, Gupta EA, Solomon AR. A pediatric case of nephrogenic fibrosing dermopathy: improvement after combination therapy. *J Am Acad Dermatol*. 2006; 54: 914-916.

Dillenseger JP, Moerschel E. Guide des technologies de l'imagerie médicale et de la radiothérapie. Masson. Issy-les-Moulineaux, France. 2009; p. 151-161.

Distler JH, Jüngel A, Pileckyte M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, Kowal-Bielecka O, Matucci-Cerinic M, Schett G, Marti HH, Gay S, Distler O. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2007; 56: 4203-4215.

Distler JH, Akhmetshina A, Schett G, Distler O. Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48: 98-103.

Do JG, Kim YB, Lee DG, Hwang JH. A case of delayed onset nephrogenic systemic fibrosis after gadolinium based contrast injection. *Ann Rehabil Med*. 2012; 36: 880-886.

Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, Kuro-o M. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem*. 2011; 286: 8655-8665.

Drouven BJ, Evans CH. Collagen fibrillogenesis in the presence of lanthanides. *J Biol Chem*. 1986; 261: 11792-11797.

Durbin PW, Williams MH, Gee M, Newman RH, Hamilton JG. Metabolism of the lanthanons in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956; 91: 78-85.

E

Edward M, Quinn JA, Mukherjee S, Jensen MB, Jardine AG, Mark PB, Burden AD. Gadodiamide contrast agent 'activates' fibroblasts: a possible cause of nephrogenic systemic fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214: 584-593. Erratum in: *J Pathol*. 2008; 214: 593.

Edward M, Quinn JA, Burden AD, Newton BB, Jardine AG. Effect of different classes of gadolinium-based contrast agents on control and nephrogenic systemic fibrosis-derived fibroblast proliferation. *Radiology*. 2010; 256: 735-743.

Eitner F, Ostendorf T, Kretzler M, Cohen CD, Eriksson U, Gröne HJ, Floege J; ERCB-Consortium. PDGF-C expression in the developing and normal adult human kidney and in glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: 1145-1153.

Elmholdt T, Jørgensen B, Ramsing M, Pedersen M, Olesen AB. Two cases of nephrogenic systemic fibrosis after exposure to the macrocyclic compound gadobutrol. *NDT Plus*. 2010; 3: 285-287.

Elmholdt TR, Pedersen M, Jørgensen B, Ramsing M, Olesen AB. Positive effect of low-dose imatinib mesylate in a patient with nephrogenic systemic fibrosis. *Acta Derm Venereol*. 2011a; 91: 478-479.

Elmholdt TR, Buus NH, Ramsing M, Olesen AB. Antifibrotic effect after low-dose imatinib mesylate treatment in patients with nephrogenic systemic fibrosis: an open-label non-randomized, uncontrolled clinical trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011b.

Elmholdt TR, Pedersen M, Jørgensen B, Søndergaard K, Jensen JD, Ramsing M, Olesen AB. Nephrogenic systemic fibrosis is found only among gadolinium-exposed patients with renal insufficiency: a case-control study from Denmark. *Br J Dermatol*. 2011c; 165: 828-836.

European Medicine Agency. Assessment report for Gadolinium-containing contrast agents. Procedure No. EMEA/H/A-31/1097. 2010. Disponible à : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/gadolinium_31/WC500099538.pdf

Evans CH. Biochemistry of the Lanthanides. *Biochemistry of the elements*. Plenum Press. New York, NY, USA. 1990; vol 8. p. 85-315.

Evenepoel P, Zeegers M, Segaert S, Claes K, Kuypers D, Maes B, Flamen P, Fransis S, Vanrenterghem Y. Nephrogenic fibrosing dermopathy: a novel, disabling disorder in patients with renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19: 469-473.

F

Fang F, Ooka K, Bhattacharyya S, Wei J, Wu M, Du P, Lin S, Del Galdo F, Feghali-Bostwick CA, Varga J. The early growth response gene *Egr2* (Alias *Krox20*) is a novel transcriptional target of transforming growth factor- β that is up-regulated in systemic sclerosis and mediates profibrotic responses. *Am J Pathol*. 2011; 178: 2077-2090.

Farivar AS, MacKinnon-Patterson B, Barnes AD, Mulligan MS. The effect of anti-inflammatory properties of mycophenolate mofetil on the development of lung reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant*. 2005; 24: 2235-2242.

Ferreira AM, Takagawa S, Fresco R, Zhu X, Varga J, DiPietro LA. Diminished induction of skin fibrosis in mice with MCP-1 deficiency. *J Invest Dermatol*. 2006; 126: 1900-1908.

Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis. *Nat Med*. 2006; 12: 99-106.

Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med*. 1998; 339: 69-75.

Fioretto P, Sutherland DE, Najafian B, Mauer M. Remodeling of renal interstitial and tubular lesions in pancreas transplant recipients. *Kidney Int*. 2006; 69: 907-912.

Fleck C. Determination of the glomerular filtration rate (GFR): methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and the influence of different drugs and toxic substances. *Physiol Res.* 1999; 48: 267-279.

Fleck C, Appenroth D, Jonas P, Koch M, Kundt G, Nizze H, Stein G. Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats--influence of sex, strain, and surgical procedure. *Exp Toxicol Pathol.* 2006; 57: 195-205.

Food and Drug Administration. US Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. July 2005. Disponible à :

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs//GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM078932.pdf>

Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: New warnings for using gadolinium based contrast agents in patients with kidney dysfunction. 2010. Disponible à : <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm223966.htm>

Francès C, Barete S, Lipsker D. Morphées. *Encycl Med Chir.* 2010; 98-505-B-10.

Frenzel T, Lengsfeld P, Schirmer H, Hütter J, Weinmann HJ. Stability of gadolinium-based contrast agents in human serum at 37°C. *Invest Radiol.* 2008; 43: 817-828.

Fretellier N, Idée JM, Guerret S, Hollenbeck C, Hartmann D, González W, Robic C, Port M, Corot C. Clinical, biological, and skin histopathologic effects of ionic macrocyclic and nonionic linear gadolinium chelates in a rat model of nephrogenic systemic fibrosis. *Invest Radiol.* 2011a; 46: 85-93.

Fretellier N, Idée JM, Dencausse A, Karroum O, Guerret S, Poveda N, Jestin G, Factor C, Raynal I, Zamia P, Port M, Corot C. Comparative in vivo dissociation of gadolinium chelates in renally impaired rats: a relaxometry study. *Invest Radiol.* 2011b; 46: 292-300.

Fretellier N, Idée J, Bruneval P, Guerret S, Daubiné F, Jestin G, Factor C, Poveda N, Dencausse A, Massicot F, Laprévote O, Mandet C, Bouzian N, Port M, Corot C. Hyperphosphataemia sensitizes renally impaired rats to the profibrotic effects of gadodiamide. *Br J Pharmacol.* 2012; 165: 1151-1162.

Fretellier N, Bouzian N, Parmentier N, Bruneval P, Jestin G, Factor C, Mandet C, Daubiné F, Massicot F, Laprévote O, Hollenbeck C, Port M, Idée JM, Corot C. Nephrogenic systemic fibrosis-like effects of magnetic resonance imaging contrast agents in rats with adenine-

induced renal failure. *Toxicol Sci.* 2013; 131: 259-270. Erratum in: *Toxicol. Sci.* 2013; 132: 252.

Friman C, Storgårds E, Juvani M, Kock B. The glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) in plasma in patients with renal insufficiency. *Clin Nephrol.* 1977; 8: 435-439.

G

Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med.* 2009; 360: 1989-2003.

Galan A, Cowper SE, Bucala R. Nephrogenic systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermatopathy). *Curr Opin Rheumatol.* 2006; 18: 614-617.

Galera C, Ozygit L, Demoly P. Anaphylaxie aux produits de contraste gadolinés. *Revue Française d'Allergologie.* 2010 ; 50 ; 556-562.

Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Trozzi L, Surrenti C, Casini A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology.* 2002; 122: 1924-1940.

George SJ, Webb SM, Abraham JL, Cramer SP. Synchrotron X-ray analyses demonstrate phosphate-bound gadolinium in skin in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol.* 2010; 163: 1077-1081.

Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP. Pharmacology of P2X channels. *Pflügers Arch* 2006; 452: 513-537.

Ghio AJ, Soukup JM, Dailey LA, Richards J, Deng Z, Abraham JL. Gadolinium exposure disrupts iron homeostasis in cultured cells. *J Biol Inorg Chem.* 2011; 16: 567-575.

Ghosh AK, Bhattacharyya S, Lakos G, Chen SJ, Mori Y, Varga J. Disruption of transforming growth factor beta signaling and profibrotic responses in normal skin fibroblasts by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 1305-1318.

Ghosh AK, Bhattacharyya S, Wei J, Kim S, Barak Y, Mori Y, Varga J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *FASEB J.* 2009; 23: 2968-2977.

Gilliet M, Cozzio A, Burg G, Nestle FO. Successful treatment of three cases of nephrogenic fibrosing dermatopathy with extracorporeal photopheresis. *Br J Dermatol.* 2005; 152: 531-536.

Girardi M, Kay J, Elston DM, Leboit PE, Abu-Alfa A, Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: clinicopathological definition and workup recommendations. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 65: 1095-1106.

Goddard DS, Magee CC, Lazar AJ, Miller DM. Nephrogenic fibrosing dermopathy with recurrence after allograft failure. *J Am Acad Dermatol.* 2007; 56: S109-111.

Gonçalves RG, Gabrich L, Rosário A Jr, Takiya CM, Ferreira ML, Chiarini LB, Persechini PM, Coutinho-Silva R, Leite M Jr. The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. *Kidney Int.* 2006; 70: 1599-1606.

Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther.* 2003; 98: 257-265.

Grant D, Johnsen H, Juelsrud A, Løvhaug D. Effects of gadolinium contrast agents in naïve and nephrectomized rats: relevance to nephrogenic systemic fibrosis. *Acta Radiol.* 2009; 50: 156-169.

Grebe SO, Borrmann M, Altenburg A, Wesselman U, Hein D, Haage P. Chronic inflammation and accelerated atherosclerosis as important cofactors in nephrogenic systemic fibrosis following intravenous gadolinium exposure. *Clin Exp Nephrol.* 2008; 12: 403-406.

Grekin SJ, Holcomb MJ, Modi GM, Huttenbach YT, Poythress EL, Diwan AH. Lollipop lesions in nephrogenic systemic fibrosis mimicking a deep fungal infection. *J Cutan Pathol.* 2012; 39: 981-984.

Gries H. Extracellular MRI contrast agents based on gadolinium. *Top. Curr. Chem.* 2002; 221: 1-24.

Grobner T. Gadolinium: a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21: 1104-1108. Erratum in: *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21: 1745.

Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J.* 2004; 18: 469-479.

Gustafson B, Eliasson B, Smith U. Thiazolidinediones increase the wingless-type MMTV integration site family (WNT) inhibitor Dickkopf-1 in adipocytes: a link with osteogenesis. *Diabetologia.* 2010; 53: 536-540.

Hällgren R, Engström-Laurent A, Nisbeth U. Circulating hyaluronate. A potential marker of altered metabolism of the connective tissue in uremia. *Nephron*. 1987; 46: 150-154.

Hamada Y, Kono TN, Moriguchi Y, Higuchi M, Fukagawa M. Alteration of mRNA expression of molecules related to iron metabolism in adenine-induced renal failure rats: a possible mechanism of iron deficiency in chronic kidney disease patients on treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 1886-1891.

Hamburg E, Radhika A. Mechanisms of dermal fibrosis after activation of β -catenin in fibroblasts. Sixth Annual Yale Fibrosis Symposium. New Haven, CT, USA. 16-17 novembre 2012. Présentation orale.

Hancox JG, Mengesha YM, Sanguenza OP, Yosipovitch G. Nephrogenic fibrosing dermopathy after five days of hemodialysis. *J Drugs Dermatol*. 2003; 2: 550-553.

Hao D, Ai T, Goerner F, Hu X, Runge VM, Tweedle M. MRI contrast agents: basic chemistry and safety. *J Magn Reson Imaging*. 2012; 36: 1060-1071.

Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol*. 1992; 52: 296-302.

Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am J Pathol*. 2003; 163: 993-1000.

Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, Bouaziz JD, Uchida J, Fujimoto M, Matsushita T, Matsushita Y, Horikawa M, Komura K, Takehara K, Sato S, Tedder TF. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. *Am J Pathol*. 2006; 169: 954-966.

Hata A, Davis BN. Control of microRNA biogenesis by TGFbeta signalling pathway-A novel role of Smads in the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20: 517-521.

Hauser C, Kaya G, Chizzolini C. Nephrogenic fibrosing dermopathy in a renal transplant recipient with tubulointerstitial nephritis and uveitis. *Dermatology*. 2004; 209: 50-52.

Haute Autorité de Santé. Commission de transparence. Avis sur l'Esbriet[®] (pirféridone) du 14 mars 2012. Disponible à :

http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-04/esbriet_14032012_avis_ct11398.pdf

Haylor J, Dencausse A, Vickers M, Nutter F, Jestin G, Slater D, Idee JM, Morcos S. Nephrogenic gadolinium biodistribution and skin cellularity following a single injection of Omniscan in the rat. *Invest Radiol.* 2010; 45: 507-512.

Haylor J, Schroeder J, Wagner B, Nutter F, Jestin G, Idée JM, Morcos S. Skin gadolinium following use of MR contrast agents in a rat model of nephrogenic systemic fibrosis. *Radiology.* 2012; 263: 107-116.

Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med.* 2009; 15: 1077-1081.

Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays.* 2007; 29: 1001-1010.

Heinz-Peer G, Neruda A, Watschinger B, Vychytil A, Geusau A, Haumer M, Weber M. Prevalence of NSF following intravenous gadolinium-contrast media administration in dialysis patients with endstage renal disease. *Eur J Radiol.* 2010; 76: 129-134.

Hergoz EL. Fibrosis Primer. Sixth Annual Yale Fibrosis Symposium. New Haven, CT, USA. 16-17 novembre 2012. Présentation orale.

Higashiyama H, Yoshimoto D, Okamoto Y, Kikkawa H, Asano S, Kinoshita M. Receptor-activated Smad localisation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol.* 2007; 60: 283-289.

Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2007; 117: 3810-3820.

High WA, Ayers RA, Chandler J, Zito G, Cowper SE. Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Acad Dermatol.* 2007; 56: 21-26.

High WA, Ranville JF, Brown M, Punshon T, Lanzirotti A, Jackson BP. Gadolinium deposition in nephrogenic systemic fibrosis: an examination of tissue using synchrotron x-ray fluorescence spectroscopy. *J Am Acad Dermatol.* 2010; 62: 38-44.

Hill AB. The environment and disease: association or causation? *Proc R Soc Med.* 1965; 58: 295-300.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007; 170: 1807-1816.

Hirano S, Suzuki KT. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ Health Perspect.* 1996; 104: 85-95.

Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, Balk E, Lau J, Levin A, Kausz AT, Eknoyan G, Levey AS; National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics.* 2003; 111: 1416-1421.

Homer RJ, Elias JA, Lee CG, Herzog E. Modern concepts on the role of inflammation in pulmonary fibrosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135: 780-788.

Hope TA, High WA, Leboit PE, Chaopathomkul B, Rogut VS, Herfkens RJ, Brasch RC. Nephrogenic systemic fibrosis in rats treated with erythropoietin and intravenous iron. *Radiology.* 2009; 253: 390-398.

Hope TA, Leboit PE, High WA, Fu Y, Brasch RC. Evaluation of imatinib mesylate as a possible treatment for nephrogenic systemic fibrosis in a rat model. *Magn Reson Imaging.* 2013; 31: 139-144.

Horan GS, Wood S, Ona V, Li DJ, Lukashev ME, Weinreb PH, Simon KJ, Hahm K, Allaire NE, Rinaldi NJ, Goyal J, Feghali-Bostwick CA, Matteson EL, O'Hara C, Lafyatis R, Davis GS, Huang X, Sheppard D, Violette SM. Partial inhibition of integrin $\alpha(v)\beta6$ prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 56-65.

Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol Sci.* 1992; 13: 134-136.

Hoste EAJ, Venkataraman R, Kellum JA. Definition, Classification, and Epidemiology of Acute Kidney Disease. *Evidence-Based Nephrology.* Edited by: Molony DA, Craig JC. 2009; 71-79.

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009; 361: 1570-1583.

Hubbard V, Davenport A, Jarmulowicz M, Rustin M. Scleromyxoedema-like changes in four renal dialysis patients. *Br J Dermatol.* 2003; 148: 563-568.

Huebener P, Schwabe RF. Regulation of wound healing and organ fibrosis by toll-like receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2012. Sous presse

Husztik E, Lázár G, Párducz A. Electron microscopic study of Kupffer-cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride. *Br J Exp Pathol.* 1980; 61: 624-630.

I

Idée JM, Port M, Raynal I, Schaefer M, Le Greneur S, Corot C. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundam Clin Pharmacol.* 2006; 20: 563-576. Erratum in: *Fundam Clin Pharmacol.* 2007; 21: 335.

Idée JM, Port M, Medina C, Lancelot E, Fayoux E, Ballet S, Corot C. Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a critical review. *Toxicology.* 2008; 248: 77-88.

Idée JM, Port M, Robic C, Medina C, Sabatou M, Corot C. Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *J Magn Reson Imaging.* 2009; 30: 1249-1258.

Igreja AC, Mesquita Kde C, Cowper SE, Costa IM. Nephrogenic systemic fibrosis: concepts and perspectives. *An Bras Dermatol.* 2012; 87: 597-607.

Ikawa Y, Ng PS, Endo K, Kondo M, Chujo S, Ishida W, Shirasaki F, Fujimoto M, Takehara K. Neutralizing monoclonal antibody to human connective tissue growth factor ameliorates transforming growth factor-beta-induced mouse fibrosis. *J Cell Physiol.* 2008; 216: 680-687.

Im DS. First-in-class antifibrotic therapy targeting type 1 lysophosphatidic acid receptor. *Arch Pharm Res.* 2012; 35: 945-948.

Ishikawa H, Takeda K, Okamoto A, Matsuo S, Isobe K. Induction of autoimmunity in a bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4+ T cells. *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 1688-1695.

Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development.* 2003; 130: 2779-2791.

J

Jacobs C. L'insuffisance rénale chronique. Comprendre, prévenir et traiter. *MEDITOR.* Wasselonne, France. 2008; 3-52.

Jain SM, Wesson S, Hassanein A, Canova E, Hoy M, Fennell RS, Dharnidharka VR. Nephrogenic fibrosing dermopathy in pediatric patients. *Pediatr Nephrol.* 2004; 19: 467-470.

Jan F, Segal JM, Dyer J, LeBoit P, Siegfried E, Frieden IJ. Nephrogenic fibrosing dermopathy: two pediatric cases. *J Pediatr.* 2003; 143: 678-681.

Janus N, Launay-Vacher V, Karie S, Clement O, Ledneva E, Frances C, Choukroun G, Deray G. Prevalence of nephrogenic systemic fibrosis in renal insufficiency patients: results of the FINEST study. *Eur J Radiol.* 2010; 73: 357-359.

Javelaud D, Mauviel A. Transforming Growth Factor- β s: signalisation et rôles physiopathologiques. *Pathologie Biologie* 2004 ; 52 : 50-54.

Jenkins W, Perone P, Walker K, Bhagavathula N, Aslam MN, DaSilva M, Dame MK, Varani J. Fibroblast response to lanthanoid metal ion stimulation: potential contribution to fibrotic tissue injury. *Biol Trace Elem Res.* 2011; 144: 621-635.

Jiko M, Yano I, Okuda M, Inui K. Altered pharmacokinetics of paclitaxel in experimental hepatic or renal failure. *Pharm Res.* 2005; 22: 228-234.

Jiménez SA, Artlett CM, Sandorfi N, Derk C, Latinis K, Sawaya H, Haddad R, Shanahan JC. Dialysis-associated systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy): study of inflammatory cells and transforming growth factor beta1 expression in affected skin. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2660-2666.

Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol.* 2006; 69: 597-607.

Joffe P, Thomsen HS, Meusel M. Pharmacokinetics of gadodiamide injection in patients with severe renal insufficiency and patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Acad Radiol.* 1998; 5: 491-502.

K

Kadiyala D, Roer DA, Perazella MA. Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadoversetamide exposure: treatment with sodium thiosulfate. *Am J Kidney Dis.* 2009; 53: 133-137.

Kallen AJ, Jung MA, Cheng S, Hess T, Turabelidze G, Abramova L, Arduino M, Guarner J, Pollack B, Saab G, Patel PR. Gadolinium-containing magnetic resonance imaging contrast and nephrogenic systemic fibrosis: a case-control study. *Am J Kidney Dis.* 2008; 51: 966-975.

Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1776-1784.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119: 1420-1428. Erratum in: *J Clin Invest.* 2010; 120: 1786.

Kamei T, Callery MP, Flye MW. Kupffer cell blockade prevents induction of portal venous tolerance in rat cardiac allograft transplantation. *J Surg Res.* 1990; 48: 393-396.

Kanapilly GM. In vitro precipitation behavior of trivalent lanthanides. *Health Phys.* 1980; 39: 343-346.

Kaplan GD, Aisen AM, Aravapalli SR. Preliminary clinical trial of gadodiamide injection: a new nonionic gadolinium contrast agent for MR imaging. *J Magn Reson Imaging.* 1991; 1: 57-62.

Karnik P, Tekeste Z, McCormick TS, Gilliam AC, Price VH, Cooper KD, Mirmirani P. Hair follicle stem cell-specific PPAR γ deletion causes scarring alopecia. *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 1243-1257.

Kastler B, Vetter D, Gangi A. Principes de l'IRM. Manuel d'auto-apprentissage. Collection d'imagerie radiologique. MASSON. Paris, Milan, Barcelone. 1994. Chapitres 1-3. p. 1-25.

Kato M, Putta S, Wang M, Yuan H, Lanting L, Nair I, Gunn A, Nakagawa Y, Shimano H, Todorov I, Rossi JJ, Natarajan R. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 881-889.

Katsumata K, Kusano K, Hirata M, Tsunemi K, Nagano N, Burke SK, Fukushima N. Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. *Kidney Int.* 2003; 64: 441-450.

Kawai T, Masaki T, Doi S, Arakawa T, Yokoyama Y, Doi T, Kohno N, Yorioka N. PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta. *Lab Invest.* 2009; 89: 47-58.

Kay J, High WA. Imatinib mesylate treatment of nephrogenic systemic fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 2543-2548.

KDOQI. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39: S1-266.

Kelly B, Petitt M, Sanchez R. Nephrogenic systemic fibrosis is associated with transforming growth factor beta and Smad without evidence of renin-angiotensin system involvement. *J Am Acad Dermatol*. 2008; 58: 1025-1030.

Kelly BC, Markle LS, Vickers JL, Petitt MS, Raimer SS, McNeese C. The imbalanced expression of matrix metalloproteinases in nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 63: 483-489.

Kim HJ, Vaziri ND. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 298: F662-671.

Kintossou R, D'Incan M, Chauveau D, Bens G, Franck F, Dauplat MM, Viraben R, Déchelotte P, Souteyrand P. [Nephrogenic fibrosing dermopathy treated with extracorporeal photopheresis: role of gadolinium?]. *Ann Dermatol Venereol*. 2007; 134: 667-671.

Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233: 109-122.

Knopp EA, Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: early recognition and treatment. *Semin Dial*. 2008; 21: 123-128.

Koeda T, Wakaki K, Koizumi F, Yokozawa T., Oura H. Early changes of proximal tubules in the kidney of adenine-ingesting rats, with special reference to biochemical and electron microscopic studies. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 1988; 30: 239-246.

Königshoff M, Eickelberg O. WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42: 21-31.

Krous HF, Breisch E, Chadwick AE, Pinckney L, Malicki DM, Benador N. Nephrogenic systemic fibrosis with multiorgan involvement in a teenage male after lymphoma, Ewing's sarcoma, end-stage renal disease, and hemodialysis. *Pediatr Dev Pathol*. 2007; 10: 395-402.

Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, Jablonska S, Blaszczyk M, Watson DK, Trojanowska M. Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol*. 2003; 163: 571-581.

Kucher C, Steere J, Elenitsas R, Siegel DL, Xu X. Nephrogenic fibrosing dermopathy/nephrogenic systemic fibrosis with diaphragmatic involvement in a patient with respiratory failure. *J Am Acad Dermatol*. 2006; 54: 31-34.

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 770-774.

Kulkarni AA, Thatcher TH, Olsen KC, Maggirwar SB, Phipps RP, Sime PJ. PPAR- γ ligands repress TGF β -induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis. *PLoS One*. 2011; 6: e15909.

Künnemeyer J, Terborg L, Meermann B, Brauckmann C, Möller I, Scheffer A, Karst U. Speciation analysis of gadolinium chelates in hospital effluents and wastewater treatment plant sewage by a novel HILIC/ICP-MS method. *Environ Sci Technol*. 2009; 43: 2884-2890.

Kuo PH. NSF-active and NSF-inert species of gadolinium: mechanistic and clinical implications. *AJR Am J Roentgenol*. 2008; 191: 1861-1863.

Kupfer I, Balguerie X, Courville P, Chinet P, Joly P. Scleroderma-like cutaneous lesions induced by paclitaxel: a case study. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 48: 279-281.

Kurtkoti J, Snow T, Hiremagalur B. Gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis: association or causation. *Nephrology (Carlton)*. 2008; 13: 235-241.

L

Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol*. 2002; 168: 6436-6445.

Lam AP, Flozak AS, Russell S, Wei J, Jain M, Mutlu GM, Budinger GR, Feghali-Bostwick CA, Varga J, Gottardi CJ. Nuclear β -catenin is increased in systemic sclerosis pulmonary fibrosis and promotes lung fibroblast migration and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 45: 915-922.

Lansman JB. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *J Gen Physiol*. 1990; 95: 679-696.

Laroche D, Dewachter P, Mouton-Faivre C, Clément O, Normandie B. Hypersensibilité immédiate aux produits de contraste. *Sang thrombose vaisseaux*. 2010 ; 22 : 429-433.

Laskin DL. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. *Chem Res Toxicol*. 2009; 22: 1376-1385.

Lauenstein TC, Salman K, Morreira R, Tata S, Tudorascu D, Baramidze G, Singh-Parker S, Martin DR. Nephrogenic systemic fibrosis: center case review. *J Magn Reson Imaging*. 2007; 26: 1198-1203.

Launay-Vacher V, Zimmer-Rapuch S, Moranne O. [How to evaluate renal function in cancer patients]. *Bull Cancer*. 2012; 99: 277-283.

Laurent TC, Laurent UBG, Fraser JRE. Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann Med*. 1996; 28: 241-253.

Laurent S, Vander Elst L, Copoix F, Muller RN. Stability of MRI paramagnetic contrast media: a proton relaxometric protocol for transmetallation assessment. *Invest Radiol*. 2001; 36: 115-122.

Laurent S, Elst LV, Muller RN. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Media Mol Imaging*. 2006; 1: 128-137.

Laurent S, Vander Elst L, Muller RN. Produits de contraste en IRM. *Radiologie et imagerie médicale - principes et technique – radioprotection*. 2009; 35-236-A-10.

Laurent S, Vander Elst L, Henoumont C, Muller RN. How to measure the transmetallation of a gadolinium complex. *Contrast Media Mol Imaging*. 2010; 5: 305-308.

Lauterbur P.C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature*. 1973; 242: 190-191.

Leask A, Parapuram SK, Shi-Wen X, Abraham DJ. Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *J Cell Commun Signal*. 2009; 3: 89-94.

Ledneva E, Janus N, Amet S, Launay-Vacher V, Deray G. Toxicités des chélates de gadolinium chez le patient insuffisant rénal. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2010; 22: 90-95.

Lemaire R, Farina G, Bayle J, Dimarzio M, Pendergrass SA, Milano A, Perbal B, Whitfield ML, Lafyatis R. Antagonistic effect of the matricellular signaling protein CCN3 on TGF-beta- and Wnt-mediated fibrillinogenesis in systemic sclerosis and Marfan syndrome. *J Invest Dermatol*. 2010; 130: 1514-1523.

Le Mignon MM, Chambon C, Warrington S, Davies R, Bonnemain B. Gd-DOTA. Pharmacokinetics and tolerability after intravenous injection into healthy volunteers. *Invest Radiol.* 1990; 25: 933-937.

Lemy AA, del Marmol V, Kolivras A, High WA, Matos C, Laporte M, Nortier JL. Revisiting nephrogenic systemic fibrosis in 6 kidney transplant recipients: a single-center experience. *J Am Acad Dermatol.* 2010; 63: 389-399.

Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009; 150: 604-612. Erratum in: *Ann Intern Med.* 2011; 155: 408.

Li JX, Liu JC, Wang K, Yang XG. Gadolinium-containing bioparticles as an active entity to promote cell cycle progression in mouse embryo fibroblast NIH3T3 cells. *J Biol Inorg Chem.* 2010; 15: 547-557.

Li JX, Fu LJ, Yang XG, Wang K. Integrin-mediated signaling contributes to gadolinium-containing-particle-promoted cell survival and G₁ to S phase cell cycle transition by enhancing focal adhesion formation. *J Biol Inorg Chem.* 2012; 17: 375-385.

Linfert DR, Schell JO, Fine DM. Treatment of nephrogenic systemic fibrosis: limited options but hope for the future. *Semin Dial.* 2008; 21: 155-159.

Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012; 5: 24.

Liu X, Zhu S, Wang T, Hummers L, Wigley FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C. Paclitaxel modulates TGFbeta signaling in scleroderma skin grafts in immunodeficient mice. *PLoS Med.* 2005; 2: e354.

Liu S, Kapoor M, Denton CP, Abraham DJ, Leask A. Loss of beta1 integrin in mouse fibroblasts results in resistance to skin scleroderma in a mouse model. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 2817-2821.

Liu S, Shi-wen X, Abraham DJ, Leask A. CCN2 is required for bleomycin-induced skin fibrosis in mice. *Arthritis Rheum.* 2011a; 63: 239-246.

Liu S, Parapuram SIK, Sha W, Shi-Wen X, Abraham D, Leask A. Deletion of CCN2 in fibroblasts rescues the fibrotic phenotype observed in PTEN deficient mice. The 12th International Workshop of Scleroderma Research. 23-27 juillet 2011b. Poster N°22.

Lokmic Z, Musyoka J, Hewitson TD, Darby IA. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012; 296: 139-185.

Lorusso V, Arbughi T, Tirone P, de Haën C. Pharmacokinetics and tissue distribution in animals of gadobenate ion, the magnetic resonance imaging contrast enhancing component of gadobenate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance). *J Comput Assist Tomogr.* 1999; 23: S181-194.

Lu D, Carson DA. Repression of beta-catenin signaling by PPAR gamma ligands. *Eur J Pharmacol.* 2010; 636: 198-202.

Luqman S, Pezzuto JM. NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res.* 2010; 24: 949-963.

Luzina IG, Todd NW, Iacono AT, Atamas SP. Roles of T lymphocytes in pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol.* 2008; 83: 237-244.

M

MacNeil S, Bains S, Johnson C, Idée JM, Factor C, Jestin G, Fretellier N, Morcos SK. Gadolinium contrast agent associated stimulation of human fibroblast collagen production. *Invest Radiol.* 2011; 46: 711-717.

Maejima Y, Okada H, Haraguchi G, Onai Y, Kosuge H, Suzuki J, Isobe M. Telmisartan, a unique ARB, improves left ventricular remodeling of infarcted heart by activating PPAR gamma. *Lab Invest.* 2011; 91: 932-944.

Maloo M, Abt P, Kashyap R, Younan D, Zand M, Orloff M, Jain A, Pentland A, Scott G, Bozorgzadeh A. Nephrogenic systemic fibrosis among liver transplant recipients: a single institution experience and topic update. *Am J Transplant.* 2006; 6: 2212-2217.

Manjunath V, Perazella MA. Imaging patients with kidney disease in the era of NSF: can it be done safely? *Clin Nephrol.* 2011; 75: 279-285.

Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep.* 2010; 11: 97-105.

Marckmann P, Skov L, Rossen K, Dupont A, Damholt MB, Heaf JG, Thomsen HS. Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2359-2362.

Marckmann P, Skov L, Rossen K, Heaf JG, Thomsen HS. Case-control study of gadodiamide-related nephrogenic systemic fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22: 3174-3178.

Markova A, Lester J, Wang J, Robinson-Bostom L. Diagnosis of common dermatopathies in dialysis patients: a review and update. *Semin Dial*. 2012; 25: 408-418.

Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005; 19: 2783-2810.

Mason RM. Connective tissue growth factor (CCN2), a pathogenic factor in diabetic nephropathy. What does it do? How does it do it? *J Cell Commun Signal*. 2009; 3: 95-104.

Mathur K, Morris S, Deighan C, Green R, Douglas KW. Extracorporeal photopheresis improves nephrogenic fibrosing dermatopathy/nephrogenic systemic fibrosis: three case reports and review of literature. *J Clin Apher*. 2008; 23: 144-150.

Maton F, Vander Elst L, Muller RN. Influence of human proteins on the relaxivity of Gd(III) complexes. *Mars 1995*. Disponible à :
<http://www.b.dk/upload/webred/bmsandbox/uploads/2012/03/bb81a28663015b7a1d828e723de7a26.pdf>

Matsuura I, Wang G, He D, Liu F. Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry*. 2005; 44: 12546-12553.

Mazhar SM, Shieh-morteza M, Kohl CA, Middleton MS, Sirlin CB. Nephrogenic systemic fibrosis in liver disease: a systematic review. *J Magn Reson Imaging*. 2009; 30: 1313-1322.

McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 666-671.

McBean LD, Dove JT, Halsted JA, Smith JC Jr. Zinc concentration in human tissues. *Am J Clin Nutr*. 1972; 25: 672-676.

Mellor HR, Bell AR, Valentin JP, Roberts RR. Cardiotoxicity associated with targeting kinase pathways in cancer. *Toxicol Sci*. 2011; 120: 14-32.

Mendoza FA, Artlett CM, Sandorfi N, Latinis K, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Description of 12 cases of nephrogenic fibrosing dermopathy and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* 2006; 35: 238-249.

Milam JE, Keshamouni VG, Phan SH, Hu B, Gangireddy SR, Hogaboam CM, Standiford TJ, Thannickal VJ, Reddy RC. PPAR-gamma agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 294: 891-901.

Millan FA, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ. Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development.* 1991; 111: 131-143.

Milles TM, LaChance AH, Moeckel GW, Cowper SE. The lollipop lesion: it's prevalence and potential diagnostic significance in nephrogenic systemic fibrosis. Fifth Annual Symposium on Nephrogenic Systemic Fibrosis and Allied Systemic Fibrosing. 20 Mai 2011. Présentation orale.

Miyamoto J, Tanikawa A, Igarashi A, Hataya H, Kobayashi K, Ikegami M, Sotome A, Nagai Y, Kameyama K, Ishiko A. Detection of iron deposition in dermal fibrocytes is a useful tool for histologic diagnosis of nephrogenic systemic fibrosis. *Am J Dermatopathol.* 2011; 33: 271-276.

Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci.* 2000; 113: 1101-1109.

Morcos SK. Nephrogenic systemic fibrosis following the administration of extracellular gadolinium based contrast agents: is the stability of the contrast agent molecule an important factor in the pathogenesis of this condition? *Br J Radiol.* 2007; 80: 73-76.

Moschella SL, Kay J, Mackool BT, Liu V. Case 35–2004. A 68-year-old man with end stage renal disease and thickening of the skin. *N Engl J Med.* 2004; 351: 2219-2227.

Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 1999; 96: 319-328.

Murashima M, Drott HR, Carlow D, et al. Removal of gadolinium by peritoneal dialysis. *Clin Nephrol.* 2008; 69: 368-372.

Musette P, Auquit Auckbur I, Begon E. [Cutaneous expression and function of Toll-like receptors]. *Ann Dermatol Venereol*. 2006; 133: 268-271.

Myllyharju J, Kivirikko KI. Identification of a novel proline-rich peptide-binding domain in prolyl 4-hydroxylase. *EMBO J*. 1999; 18: 306-312.

N

Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 1997; 389: 631-635.

Nakerakanti SS, Kapanadze B, Yamasaki M, Markiewicz M, Trojanowska M. Fli1 and Ets1 have distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program. *J Biol Chem*. 2006; 281: 25259-25269.

Nazarian RM, Mandal RV, Kagan A, Kay J, Duncan LM. Quantitative assessment of dermal cellularity in nephrogenic systemic fibrosis: a diagnostic aid. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 64: 741-747.

Newton BB, Jimenez SA. Mechanism of NSF: New evidence challenging the prevailing theory. *J Magn Reson Imaging*. 2009; 30: 1277-1283.

Nickoloff BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol*. 1991; 127: 523-529.

Niendorf HP, Dinger JC, Haustein J, Cornelius I, Alhassan A, Clauss W. Tolerance data of Gd-DTPA: a review. *Eur J Radiol*. 1991; 13: 15-20.

Niendorf HP, Seifert W. Serum iron and serum bilirubin after administration of Gd-DTPA-dimeglumine. A pharmacologic study in healthy volunteers. *Invest Radiol*. 1988; 23: S275-S280.

O

Obermoser G, Emberger M, Wieser M, Zelger B. Nephrogenic fibrosing dermopathy in two patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004; 13: 609-612.

Okada H, Kaneko Y, Yawata T, Uyama H, Ozono S, Motomiya Y, Hirao Y. Reversibility of adenine-induced renal failure in rats. *Clin Exp Nephrol*. 1999; 3: 82-88.

Okada M, Yan SF, Pinsky DJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) activation suppresses ischemic induction of Egr-1 and its inflammatory gene targets. *FASEB J*. 2002; 16: 1861-1868.

Okada E, Yamanaka M, Ishikawa O. New insights into the mechanism of abnormal calcification in nephrogenic systemic fibrosis - gadolinium promotes calcium deposition of mesenchymal stem cells and dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2011; 62: 58-63.

Oksendal AN, Hals PA. Biodistribution and toxicity of MR imaging contrast media. *J Magn Reson Imaging*. 1993; 3: 157-165.

Oh CJ, Kim JY, Choi YK, Kim HJ, Jeong JY, Bae KH, Park KG, Lee IK. Dimethylfumarate attenuates renal fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor- β /smad signaling. *PLoS One*. 2012; 7: e45870.

Oste L, Behets GJ, Dams G, Bervoets AR, Marynissen RL, Geryl H, Van Hoof VO, De Broe ME, D'Haese PC. Role of dietary phosphorus and degree of uremia in the development of renal bone disease in rats. *Ren Fail*. 2007; 29: 1-12.

Ostendorf T, van Roeyen CR, Peterson JD, Kunter U, Eitner F, Hamad AJ, Chan G, Jia XC, Macaluso J, Gazit-Bornstein G, Keyt BA, Lichenstein HS, LaRochelle WJ, Floege J. A fully human monoclonal antibody (CR002) identifies PDGF-D as a novel mediator of mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: 2237-2247.

Othersen JB, Maize JC, Woolson RF, Budisavljevic MN. Nephrogenic systemic fibrosis after exposure to gadolinium in patients with renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22: 3179-3185.

P

Palinkas Zoltan. Thermodynamic, kinetic, and relaxation studies on lanthanides complexes of open-chain and macrocyclic ligands. Thèse de doctorat, sous la direction d'Eva Jakab Toth, Imre Toth et Erno Brucher. Université Debrecen. Décembre 2012.

Pallet N et Anglicheau D. Transition épithélio-mésenchymateuse : aspects fondamentaux. *Actualités néphrologiques Jean Hamburger*. 2008; 87-98.

Panesar M, Banerjee P, Barone GW. Clinical Improvement of nephrogenic systemic fibrosis after kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2008; 23: 803-808.

Panesar M, Boateng F, Patel SS, Masood SF, Mahajan P, Patel N, Murray B. Transmetallation and gadolinium: do low iron stores prevent the development of nephrogenic systemic fibrosis in high-risk end-stage renal disease patients? *Hemodial Int*. 2010; 14: 289-294.

Parapuram SK, Shi-wen X, Elliott C, Welch ID, Jones H, Baron M, Denton CP, Abraham DJ, Leask A. Loss of PTEN expression by dermal fibroblasts causes skin fibrosis. *J Invest Dermatol*. 2011; 131: 1996-2003.

Pariante JL, Villars F, Conort P. Biomatériaux et Génie Tissulaire en Urologie - PARTIE B : Applications à l'urologie - Chapitre VII : Les matériaux biologiques. *Prog Urol*, 2005; 15: 964-970.

Pasch A, Schaffner T, Huynh-Do U, Frey BM, Frey FJ, Farese S. Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. *Kidney Int*. 2008; 74: 1444-1453.

Pascolo L, Cupelli F, Anelli PL, Lorusso V, Visigalli M, Uggeri F, Tiribelli C. Molecular mechanisms for the hepatic uptake of magnetic resonance imaging contrast agents. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257: 746-752.

Pattanaik D, Postlethwaite AE. A role for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Discov Med*. 2010; 10: 161-167.

Patterson KC, Weissmann A, Ahmadi T, Farber HW. Imatinib mesylate in the treatment of refractory idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med*. 2006; 145: 152-153.

Penfield JG, Reilly RF. Gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis: have we overreacted? *Semin Dial*. 2011; 24: 480-486.

Perazella MA, Ishibe S, Perazella MA, Reilly RF. Nephrogenic fibrosing dermopathy: an unusual skin condition associated with kidney disease. *Semin Dial*. 2003; 16: 276-280.

Perazella MA. Tissue deposition of gadolinium and development of NSF: a convergence of factors. *Semin Dial*. 2008; 21: 150-154.

Pereira LV, Shimizu MH, Rodrigues LP, Leite CC, Andrade L, Seguro AC. N-acetylcysteine protects rats with chronic renal failure from gadolinium-chelate nephrotoxicity. *PLoS One*. 2012; 7 :e39528.

Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet*. 2004; 363: 62-64.

Perez-Rodriguez J, Lai S, Ehst BD, Fine DM, Bluemke DA. Nephrogenic systemic fibrosis: incidence, associations, and effect of risk factor assessment. Report of 33 cases. *Radiology*. 2009; 250: 371-317.

Perone PA, Weber SL, DaSilva M, Paruchuri T, Bhagavathula N, Aslam MN, Dame MK, Johnson KJ, Swartz RD, Varani J. Collagenolytic activity is suppressed in organ-cultured human skin exposed to a gadolinium-based MRI contrast agent. *Invest Radiol*. 2010; 45: 42-48.

Pesek GD, Tyler L, Theus J, et al. Extracorporeal photopheresis (ECP), a promising treatment for nephrogenic fibrosing dermatopathy (NFD). *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 460A.

Piera-Velazquez S, Louneva N, Fertala J, Wermuth PJ, Del Galdo F, Jimenez SA. Persistent activation of dermal fibroblasts from patients with gadolinium-associated nephrogenic systemic fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69: 2017-2023.

Pietsch H, Lengsfeld P, Steger-Hartmann T, Löwe A, Frenzel T, Hütter J, Sieber MA. Impact of renal impairment on long-term retention of gadolinium in the rodent skin following the administration of gadolinium-based contrast agents. *Invest Radiol*. 2009a; 44: 226-233.

Pietsch H, Pering C, Lengsfeld P, Walter J, Steger-Hartmann T, Golfier S, Frenzel T, Hütter J, Weinmann HJ, Sieber MA. Evaluating the role of zinc in the occurrence of fibrosis of the skin: a preclinical study. *J Magn Reson Imaging*. 2009b; 30: 374-383.

Pietsch H, Raschke M, Ellinger-Ziegelbauer H, Jost G, Walter J, Frenzel T, Lenhard D, Hütter J, Sieber MA. The role of residual gadolinium in the induction of nephrogenic systemic fibrosis-like skin lesions in rats. *Invest Radiol*. 2011a; 46: 48-56.

Pietsch H, Jost G, Frenzel T, Raschke M, Walter J, Schirmer H, Hütter J, Sieber MA. Efficacy and safety of lanthanoids as X-ray contrast agents. *Eur J Radiol*. 2011b; 80: 349-356.

Pinzani M, Gentilini A, Caligiuri A, De Franco R, Pellegrini G, Milani S, Marra F, Gentilini P. Transforming growth factor-beta 1 regulates platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human liver fat-storing cells. *Hepatology*. 1995; 21: 232-239.

Pines M, Nagler A. Halofuginone: a novel antifibrotic therapy. *Gen Pharmacol*. 1998; 30: 445-450.

Pirovano G, Munley J, Schultz C, Parker J, Kirchin MA, Quince K, Spinazzi A. Nephrogenic systemic fibrosis: a review of published cases and results from three prospective observational studies. *European Congress of Radiology*. 2012; 3: n.B-0699. Presentation orale.

Pontén A, Li X, Thorén P, Aase K, Sjöblom T, Ostman A, Eriksson U. Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-C in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 2003; 163: 673-682.

Port M, Corot C, Violas X, Robert P, Raynal I, Gagneur G. How to compare the efficiency of albumin-bound and nonalbumin-bound contrast agents in vivo: the concept of dynamic relaxivity. *Invest Radiol*. 2005; 40: 565-573.

Port M, Idée JM, Medina C, Robic C, Sabatou M, Corot C. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biometals*. 2008; 21: 469-490.

Pradère JP, Klein J, Grès S, Guigné C, Neau E, Valet P, Calise D, Chun J, Bascands JL, Saulnier-Blache JS, Schanstra JP. LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 3110-3118.

Pradère JP, Gonzalez J, Klein J, Valet P, Grès S, Salant D, Bascands JL, Saulnier-Blache JS, Schanstra JP. Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1781: 582-587.

Prey S, Ezzedine K, Doussau A, Grandoulier AS, Barcat D, Chatelus E, Diot E, Durant C, Hachulla E, de Korwin-Krokowski JD, Kostrzewa E, Quemeneur T, Paul C, Schaefferbeke T, Seneschal J, Solanilla A, Sparsa A, Bouchet S, Lepreux S, Mahon FX, Chene G, Taïeb A. Imatinib mesylate in scleroderma-associated diffuse skin fibrosis: a phase II multicentre randomized double-blinded controlled trial. *Br J Dermatol*. 2012; 167: 1138-1144.

Prince MR, Zhang H, Morris M, MacGregor JL, Grossman ME, Silberzweig J, DeLapaz RL, Lee HJ, Magro CM, Valeri AM. Incidence of nephrogenic systemic fibrosis at two large medical centers. *Radiology*. 2008; 248: 807-816.

Pryor JG, Poggioli G, Galaria N, Gust A, Robison J, Samie F, Hanjani NM, Scott GA. Nephrogenic systemic fibrosis: a clinicopathologic study of six cases. *J Am Acad Dermatol*. 2007; 57: 105-111.

Purcell E, Torrey HC, Pound RV. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys Rev*. 1946; 69: 37-38.

R

Rabi II, Zacharias JR, Millman S, Kusch P. A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Phys Rev.* 1938; 53: 318.

Rai RM, Zhang JX, Clemens MG, Diehl AM. Gadolinium chloride alters the acinar distribution of phagocytosis and balance between pro- and anti-inflammatory cytokines. *Shock.* 1996; 6: 243-247.

Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol.* 2009; 8: 283-291.

Reiter T, Ritter O, Prince MR, Nordbeck P, Wanner C, Nagel E, Bauer WR. Minimizing risk of nephrogenic systemic fibrosis in cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2012; 14: 31.

Remuzzi A, Gagliardini E, Donadoni C, Fassi A, Sangalli F, Lepre MS, Remuzzi G, Benigni A. Effect of angiotensin II antagonism on the regression of kidney disease in the rat. *Kidney Int.* 2002; 62: 885-894.

Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 358-365.

Ricardo SD, Van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3522-3530.

Richmond H, Zwerner J, Kim Y, Fiorentino D. Nephrogenic systemic fibrosis: Relationship to gadolinium and response to photopheresis. *Arch Dermatol.* 2007; 143: 1025-1030.

Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem.* 2005; 280: 7409-7412.

Riser BL, Bhagavathula N, Perone P, Garchow K, Xu Y, Fisher GJ, Najmabadi F, Attili D, Varani J. Gadolinium-induced fibrosis is counter-regulated by CCN3 in human dermal fibroblasts: a model for potential treatment of nephrogenic systemic fibrosis. *J Cell Commun Signal.* 2012; 6: 97-105.

Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab.* 1998; 24: 111-119.

Robic C, Catoen S, De Goltstein MC, Idée JM, Port M. The role of phosphate on Omniscan® dechelation: an in vitro relaxivity study at pH 7. *Biometals*. 2011; 24: 759-768. Erratum in: *Biometals*. 2011; 24: 769.

Robinson MR, Routhouska SB, Paspulati RM, Korman NJ. Alefacept therapy for nephrogenic systemic fibrosis: a case series. *J Drugs Dermatol*. 2011; 10: 922-924.

Rodby RA. Can gadolinium be given safely to a patient on dialysis? *Semin Dial*. 2011; 24: 370-371.

Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*. 2008; 3: 99-126.

Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol*. 2005; 40: 715-724.

Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*. 2001; 276: 37731-37734.

Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2004; 63: 423-432.

Ross B, D'Orléans-Juste P, Giaid A. Potential role of endothelin-1 in pulmonary fibrosis: from the bench to the clinic. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42: 16-20.

Rowe PSN, Hedge AM, Laurence JS, Lee SP, Brooks WM, McCarthy ET. Gadodiamide (Gd-OMN) Binds Circulating ASARM-Peptides: A Model for Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF). American Society of Nephrology: Renal Week. Denver, CO, USA. 18 novembre 2010. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: abstract TH-FC069. Présentation orale.

Runge VM, Ai T, Hao D, Hu X. The developmental history of the gadolinium chelates as intravenous contrast media for magnetic resonance. *Invest Radiol*. 2011; 46: 807-816.

S

Saab G, Abu-Alfa A. Are patients with moderate renal failure at risk for developing nephrogenic systemic fibrosis? *Radiology*. 2007; 244: 930-931; author reply 931-932.

Sadowski EA, Bennett LK, Chan MR, Wentland AL, Garrett AL, Garrett RW, Djamali A. Nephrogenic systemic fibrosis: risk factors and incidence estimation. *Radiology*. 2007; 243: 148-157.

Santhanam AV, d'Uscio LV, Peterson TE, Katusic ZS. Activation of endothelial nitric oxide synthase is critical for erythropoietin-induced mobilization of progenitor cells. *Peptides*. 2008; 29: 1451-1455.

Santiago B, Gutierrez-Cañas I, Dotor J, Palao G, Lasarte JJ, Ruiz J, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Pablos JL. Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol*. 2005; 125: 450-455.

Sanyal S, Marckmann P, Scherer S, Abraham JL. Multiorgan gadolinium (Gd) deposition and fibrosis in a patient with nephrogenic systemic fibrosis—an autopsy-based review. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26: 3616-3626.

Schaefer CJ, Ruhrmund DW, Pan L, Seiwert SD, Kossen K. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. *Eur Respir Rev*. 2011; 20: 85-97.

Schieren G, Wirtz N, Altmeyer P, Rump LC, Weiner SM, Kreuter A. Nephrogenic systemic fibrosis—a rapidly progressive disabling disease with limited therapeutic options. *J Am Acad Dermatol*. 2009; 61: 868-874.

Schieren G, Gambichler T, Skrygan M, Burkert B, Altmeyer P, Rump LC, Kreuter A. Balance of profibrotic and antifibrotic signaling in nephrogenic systemic fibrosis skin lesions. *Am J Kidney Dis*. 2010; 55: 1040-1049.

Schroeder JA, Weingart C, Coras B, Hausser I, Reinhold S, Mack M, Seybold V, Vogt T, Banas B, Hofstaedter F, Krämer BK. Ultrastructural evidence of dermal gadolinium deposits in a patient with nephrogenic systemic fibrosis and end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3: 968-975.

Schroll S, Arzt M, Sebah D, Nüchterlein M, Blumberg F, Pfeifer M. Improvement of bleomycin-induced pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis by the endothelin receptor antagonist Bosentan. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010; 170: 32-36.

Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*. 2007; 13: 1324-1332.

Senet P, Francès C, Lipsker D. [Nephrogenic systemic fibrosis]. *Ann Dermatol Venereol*. 2009; 136: 379-386.

Sessler JL, Mody TD, Hemmi GW, Lynch V. Synthesis and structural characterization of lanthanide(III) texaphyrins. *Inorg. Chem*. 1993; 32: 3175-3187.

Shabana WM, Cohan RH, Ellis JH, Hussain HK, Francis IR, Su LD, Mukherji SK, Swartz RD. Nephrogenic systemic fibrosis: a report of 29 cases. *AJR Am J Roentgenol*. 2008; 190: 736-741.

Shaker ME, Shiha GE, Ibrahim TM. Comparison of early treatment with low doses of nilotinib, imatinib and a clinically relevant dose of silymarin in thioacetamide-induced liver fibrosis. *Eur J Pharmacol*. 2011; 670: 593-600.

Shetty N, Derk CT. Endothelin receptor antagonists as disease modifiers in systemic sclerosis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011; 10: 19-26.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003; 113: 685-700.

Shiomi T, Tsutsui H, Hayashidani S, Suematsu N, Ikeuchi M, Wen J, Ishibashi M, Kubota T, Egashira K, Takeshita A. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2002; 106: 3126-3132.

Shi-Wen X, Renzoni EA, Kennedy L, Howat S, Chen Y, Pearson JD, Bou-Gharios G, Dashwood MR, du Bois RM, Black CM, Denton CP, Abraham DJ, Leask A. Endogenous endothelin-1 signaling contributes to type I collagen and CCN2 overexpression in fibrotic fibroblasts. *Matrix Biol*. 2007; 26: 625-632.

Shi-Wen X, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor*. 2008; 19: 133-144.

Sieber MA, Pietsch H, Walter J, Haider W, Frenzel T, Weinmann HJ. A preclinical study to investigate the development of nephrogenic systemic fibrosis: a possible role for gadolinium-based contrast media. *Invest Radiol*. 2008a; 43: 65-75.

Sieber MA, Lengsfeld P, Frenzel T, Golfier S, Schmitt-Willich H, Siegmund F, Walter J, Weinmann HJ, Pietsch H. Preclinical investigation to compare different gadolinium-based contrast agents regarding their propensity to release gadolinium in vivo and to trigger nephrogenic systemic fibrosis-like lesions. *Eur Radiol*. 2008b; 18: 2164-2173.

Sieber MA, Lengsfeld P, Walter J, Schirmer H, Frenzel T, Siegmund F, Weinmann HJ, Pietsch H. Gadolinium-based contrast agents and their potential role in the pathogenesis of nephrogenic systemic fibrosis: the role of excess ligand. *J Magn Reson Imaging*. 2008c; 27: 955-962.

Simon JC, Pfiieger D, Schöpf E. Recent advances in phototherapy. *Eur J Dermatol.* 2000; 10: 642-645.

Smythe WR, Alfrey AC, Craswell PW, Crouch CA, Ibels LS, Kubo H, Nunnelley LL, Rudolph H. Trace element abnormalities in chronic uremia. *Ann Intern Med.* 1982; 96: 302-310.

Solini A, Chiozzi P, Morelli A, Adinolfi E, Rizzo R, Baricordi OR, Di Virgilio F. Enhanced P2X7 activity in human fibroblasts from diabetic patients: a possible pathogenetic mechanism for vascular damage in diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1240-1245.

Song J, Volkov S, Shea CR, Alegre ML, Salgia R, Gregg K, Curran JJ, Woodruff J, Krausz T, Levine JS, Sweiss NJ. Nephrogenic systemic fibrosis associated with stromal and vascular calcification, report of two cases. *J Cutan Pathol.* 2009; 36: 31-34.

Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, Naff K, Van Pelt CS, Nakamura H, Leask A, Abraham D, Bou-Gharios G, de Crombrughe B. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62: 1523-1532.

Soria JC, Blay JY, Spano JP, Pivot X, Coscas Y, Khayat D. Added value of molecular targeted agents in oncology. *Ann Oncol.* 2011; 22: 1703-1716.

Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009; 276: 161-214.

Spencer AJ, Wilson SA, Batchelor J, Reid A, Rees J, Harpur E. Gadolinium chloride toxicity in the rat. *Toxicol Pathol.* 1997; 25: 245-255.

Spinazzi A, Lorusso V, Pirovano G, Kirchin M. Safety, tolerance, biodistribution, and MR imaging enhancement of the liver with gadobenate dimeglumine: results of clinical pharmacologic and pilot imaging studies in nonpatient and patient volunteers. *Acad Radiol.* 1999; 6: 282-291.

Steger-Hartmann T, Raschke M, Riefke B, Pietsch H, Sieber MA, Walter J. The involvement of pro-inflammatory cytokines in nephrogenic systemic fibrosis – a mechanistic hypothesis based on preclinical results from a rat model treated with gadodiamide. *Exp Toxicol Pathol.* 2009; 61: 537-552.

Stockmann C, Kerdiles Y, Nomaksteinsky M, Weidemann A, Takeda N, Doedens A, Torres-Collado AX, Iruela-Arispe L, Nizet V, Johnson RS. Loss of myeloid cell-derived vascular

endothelial growth factor accelerates fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 4329-4334.

Stratta P, Canavese C, Aime S. Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging, renal failure and nephrogenic systemic fibrosis/nephrogenic fibrosing dermopathy. *Curr Med Chem*. 2008; 15: 1229-1235.

Streams BN, Liu V, Liégeois N, Moschella SM. Clinical and pathologic features of nephrogenic fibrosing dermopathy: a report of two cases. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 48: 42-47.

Swaminathan S, Horn TD, Pellowski D, Abul-Ezz S, Bornhorst JA, Viswamitra S, Shah SV. Nephrogenic systemic fibrosis, gadolinium, and iron mobilization. *N Engl J Med*. 2007; 357: 720-722.

Swaminathan S, Shah SV. New insights into nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 2636-2643.

Swaminathan S, High WA, Ranville J, Horn TD, Hiatt K, Thomas M, Brown HH, Shah SV. Cardiac and vascular metal deposition with high mortality in nephrogenic systemic fibrosis. *Kidney Int*. 2008; 73: 1413-1418.

Swaminathan S, Arbiser JL, Hiatt KM, High W, Abul-Ezz S, Horn TD, Shah SV. Rapid improvement of nephrogenic systemic fibrosis with rapamycin therapy: possible role of phospho-70-ribosomal-S6 kinase. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 62: 343-345.

Swaminathan S. Klotho/FGF23: Roles in Fibrosis. Fifth Annual Yale Fibrosis Symposium. New Haven, CT, USA. 20-21 mai 2011. Présentation orale.

Swaminathan S. CD163+ cells and gadolinium toxicity. Sixth Annual Yale Fibrosis Symposium. New Haven, CT, USA. 16-17 novembre 2012. Présentation orale.

Swartz RD, Crofford LJ, Phan SH, Ike RW, Su LD. Nephrogenic fibrosing dermopathy: a novel cutaneous fibrosing disorder in patients with renal failure. *Am J Med*. 2003; 114: 563-572.

T

Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med*. 2008; 14: 45-54.

Tager AM. LPA1 in IPF and scleroderma. Sixth Annual Yale Fibrosis Symposium. New Haven, CT, USA. 16-17 novembre 2012. Présentation orale.

Takehara K, Sato S. Localized scleroderma is an autoimmune disorder. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44: 274-279.

Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, Arriola E, Silver R, Strange C, Bolster M, Seibold JR, Riley DJ, Hsu VM, Varga J, Schraufnagel DE, Theodore A, Simms R, Wise R, Wigley F, White B, Steen V, Read C, Mayes M, Parsley E, Mubarak K, Connolly MK, Golden J, Olman M, Fessler B, Rothfield N, Metersky M; Scleroderma Lung Study Research Group. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med*. 2006; 354: 2655-2666.

Taupitz M, Stolzenburg N, Ebert M, Schnorr J, Hauptmann R, Kratz H, Hamm B, Wagner S. Gadolinium-containing magnetic resonance contrast media: investigation on the possible transchelation of Gd(3+) to the glycosaminoglycan heparin. *Contrast Media Mol Imaging*. 2013; 8: 108-116.

Thakral C, Alhariri J, Abraham JL. Long-term retention of gadolinium in tissues from nephrogenic systemic fibrosis patient after multiple gadolinium-enhanced MRI scans: case report and implications. *Contrast Media Mol Imaging*. 2007; 2: 199-205.

Thakral C, Abraham JL. Gadolinium-induced nephrogenic systemic fibrosis is associated with insoluble Gd deposits in tissues: in vivo transmetallation confirmed by microanalysis. *Cutan Pathol*. 2009; 36: 1244-1254.

Thomsen HS. Magnetic resonance contrast media. *EJHP*. 2005; 2: 60-62.

Thomsen HS, Morcos SK, Almén T, Bellin MF, Bertolotto M, Bongartz G, Clement O, Leander P, Heinz-Peer G, Reimer P, Stacul F, van der Molen A, Webb JA. Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium-based contrast media: updated ESUR Contrast Medium Safety Committee guidelines. *Eur Radiol*. 2013; 23: 307-318.

Ting WW, Stone MS, Madison KC, Kurtz K. Nephrogenic fibrosing dermopathy with systemic involvement. *Arch Dermatol*. 2003; 139: 903-906.

Tokumura A, Carbone LD, Yoshioka Y, Morishige J, Kikuchi M, Postlethwaite A, Watsky MA. Elevated serum levels of arachidonoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in systemic sclerosis. *Int J Med Sci*. 2009; 6: 168-176.

Tombach B, Bremer C, Reimer P, Matzkies F, Schaefer RM, Ebert W, Geens V, Eisele J, Heindel W. Using highly concentrated gadobutrol as an MR contrast agent in patients also requiring hemodialysis: safety and dialysability. *AJR Am J Roentgenol.* 2002; 178: 105-109.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994; 79: 1147-1156. Erratum in: *Cell* 1995; 80: 957.

Tran KT, Prather HB, Cockerell CJ, Jacobe H. UV-A1 therapy for nephrogenic systemic fibrosis. *Arch Dermatol.* 2009; 145: 1170-1174.

Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47: 2-4.

Tsugawa K, Jones MK, Sugimachi K, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Biological role of phosphatase PTEN in cancer and tissue injury healing. *Front Biosci.* 2002; 7: e245-251.

Tsushima Y, Kanal E, Thomsen HS. Nephrogenic systemic fibrosis: risk factors suggested from Japanese published cases. *Br J Radiol.* 2010; 83: 590-595.

U

Uto H, Nakanishi C, Ido A, Hasuike S, Kusumoto K, Abe H, Numata M, Nagata K, Hayashi K, Tsubouchi H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, pioglitazone, inhibits fat accumulation and fibrosis in the livers of rats fed a choline-deficient, l-amino acid-defined diet. *Hepato Res.* 2005; 32: 235-242.

V

Vakil V, Sung JJ, Piecychna M, Crawford JR, Kuo P, Abu-Alfa AK, Cowper SE, Bucala R, Gomer RH. Gadolinium-containing magnetic resonance image contrast agent promotes fibrocyte differentiation. *J Magn Reson Imaging.* 2009; 30: 1284-1288.

van Amerongen R, Berns A. Targeted anticancer therapies: mouse models help uncover the mechanisms of tumor escape. *Cancer Cell.* 2008; 13: 5-7. Erratum in: *Cancer Cell.* 2008; 13: 287.

van Daele PL, Dik WA, Thio HB, van Hal PT, van Laar JA, Hooijkaas H, van Hagen PM. Is imatinib mesylate a promising drug in systemic sclerosis? *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 2549-2552.

Varani J, DaSilva M, Warner RL, Deming MO, Barron AG, Johnson KJ, Swartz RD. Effects of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents on human skin in organ culture and human skin fibroblasts. *Invest Radiol.* 2009; 44: 74-81.

Varga J, Pasche B. Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5: 200-206.

Verrecchia F, Tacheau C, Wagner EF, Mauviel A. A central role for the JNK pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven SMAD3/4-specific gene expression. *J Biol Chem.* 2003; 278: 1585-1593.

Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 3056-3062.

Verrecchia F. La cicatrisation normale : mécanismes physiologiques et modèles expérimentaux. Cours disponible sur internet. 2011. Disponible à : http://www.cicatrisation.info/d_u/cours2011/pdf/Verrecchia_2011.pdf

Vorobiov M, Basok A, Tovbin D, Shnaider A, Katchko L, Rogachev B. Iron-mobilizing properties of the gadolinium-DTPA complex: clinical and experimental observations. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 884-887.

W

Wadas TJ, Sherman CD, Miner JH, Duncan JR, Anderson CJ. The biodistribution of [153Gd]Gd-labeled magnetic resonance contrast agents in a transgenic mouse model of renal failure differs greatly from control mice. *Magn Reson Med.* 2010; 64: 1274-1280.

Wagner B, Tan C, Barnes JL, Ahuja S, Davis TL, Gorin Y, Jimenez F. Nephrogenic systemic fibrosis: evidence for oxidative stress and bone marrow-derived fibrocytes in skin, liver, and heart lesions using a 5/6 nephrectomy rodent model. *Am J Pathol.* 2012; 181: 1941-1952.

Wahab N, Cox D, Witherden A, Mason RM. Connective tissue growth factor (CTGF) promotes activated mesangial cell survival via up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1). *Biochem J.* 2007; 406: 131-138.

Wahba IM, Simpson EL, White K. Gadolinium is not the only trigger for nephrogenic systemic fibrosis: insights from two cases and review of the recent literature. *Am J Transplant.* 2007; 7: 2425-2432.

- Wang CM, Chang YY, Sun SH. Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF-beta 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell Signal*. 2003; 15: 1129-1137.
- Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 2271-2279.
- Wang Y, Alkasab TK, Narin O, Nazarian RM, Kaewlai R, Kay J, Abujudeh HH. Incidence of nephrogenic systemic fibrosis after adoption of restrictive gadolinium-based contrast agent guidelines. *Radiology*. 2011; 260: 105-111.
- Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res*. 1996; 145: 523-531.
- Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, Aoki J, Hama K, Okudaira S, Tanaka M, Tomiya T, Yanase M, Tejima K, Nishikawa T, Arai M, Arai H, Omata M, Fujiwara K, Yatomi Y. Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol*. 2007a; 41: 616-623.
- Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, Tomiya T, Tejima K, Nishikawa T, Arai M, Yanase M, Aoki J, Arai H, Omata M, Fujiwara K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity. *Life Sci*. 2007b; 81: 1009-1015.
- Wedeking P, Kumar K, Tweedle MF. Dose-dependent biodistribution of [¹⁵³Gd]Gd(acetate)_n in mice. *Nucl Med Biol*. 1993; 20: 679-691.
- Wei J, Ghosh AK, Sargent JL, Komura K, Wu M, Huang QQ, Jain M, Whitfield ML, Feghali-Bostwick C, Varga J. PPAR γ downregulation by TGF β in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis. *PLoS One*. 2010; 5: e13778.
- Wei J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmun Rev*. 2011a; 10: 267-275.
- Wei J, Zhu H, Komura K, Lord G, Varga J. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) is a novel antifibrotic factor implicated in systemic sclerosis. The 12th International Workshop of Scleroderma Research. 23-27 juillet 2011b. Poster N°49.

Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R, Gottardi CJ, MacDougald OA, Varga J. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum.* 2011c; 63: 1707-1717.

Wei J, Bhattacharyya S, Jain M, Varga J. Regulation of Matrix Remodeling by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ : A Novel Link Between Metabolism and Fibrogenesis. *Open Rheumatol J.* 2012; 6: 103-115.

Weiss AS, Lucia MS, Teitelbaum I. A case of nephrogenic fibrosing dermopathy/nephrogenic systemic fibrosis. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007; 3: 111-115.

Wermuth PJ, Del Galdo F, Jiménez SA. Induction of the expression of profibrotic cytokines and growth factors in normal human peripheral blood monocytes by gadolinium contrast agents. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 1508-1518.

Wermuth PJ, Jimenez SA. Gadolinium compounds signaling through TLR4 and TLR7 in normal human macrophages: establishment of a proinflammatory phenotype and implications for the pathogenesis of nephrogenic systemic fibrosis. *J Immunol.* 2012; 189: 318-327.

Wertman R, Altun E, Martin DR, Mitchell DG, Leyendecker JR, O'Malley RB, Parsons DJ, Fuller ER 3rd, Semelka RC. Risk of nephrogenic systemic fibrosis: evaluation of gadolinium chelate contrast agents at four American universities. *Radiology.* 2008; 248: 799-806.

White GW, Gibby WA, Tweedle MF. Comparison of Gd(DTPA-BMA) (Omniscan) versus Gd(HP-DO3A) (ProHance) relative to gadolinium retention in human bone tissue by inductively coupled plasma mass spectroscopy. *Invest Radiol.* 2006; 41: 272-278.

Wiedemeyer K, Kutzner H, Abraham JL, Thakral C, Carlson JA, Tran TA, Hausser I, Hartschuh W. The evolution of osseous metaplasia in localized cutaneous nephrogenic systemic fibrosis: a case report. *Am J Dermatopathol.* 2009; 31: 674-681.

Wilkes MC, Leof EB. Transforming growth factor beta activation of c-Abl is independent of receptor internalization and regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and PAK2 in mesenchymal cultures. *J Biol Chem.* 2006; 281: 27846-27854.

Wollanka H, Weidenmaier W, Giersig C. NSF after Gadovist exposure: a case report and hypothesis of NSF development. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24: 3882-3884.

Wong J. Gadolinium prescribing trends. The effect of regulatory actions. *Pharmacoepidemiol Drug Safety.* 2012 ; 21 : 462 [résumé].

Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 15587-15591.

Wu M, Melichian DS, Chang E, Warner-Blankenship M, Ghosh AK, Varga J. Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Am J Pathol*. 2009a; 174: 519-533.

Wu M, Melichian DS, de la Garza M, Gruner K, Bhattacharyya S, Barr L, Nair A, Shahrara S, Sporn PH, Mustoe TA, Tourtellotte WG, Varga J. Essential roles for early growth response transcription factor Egr-1 in tissue fibrosis and wound healing. *Am J Pathol*. 2009b; 175: 1041-1055.

Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 425-456.

Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007; 117: 524-529.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214: 199-210.

Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010; 30: 245-257.

Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2012; 18: 1028-1040.

X

Xing Y, Niu T, Wang W, Li J, Li S, Janicki JS, Ruiz S, Meyer CJ, Wang XL, Tang D, Zhao Y, Cui T. Triterpenoid dihydro-CDDO-trifluoroethyl amide protects against maladaptive cardiac remodeling and dysfunction in mice: a critical role of Nrf2. *PLoS One*. 2012; 7: e44899.

Xu MY, Porte J, Knox AJ, Weinreb PH, Maher TM, Violette SM, McAnulty RJ, Sheppard D, Jenkins G. Lysophosphatidic acid induces alpha6 beta1 integrin-mediated TGF-beta activation via the LPA2 receptor and the small G protein G alpha(q). *Am J Pathol*. 2009; 174: 1264-1279.

Y

Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med*. 1992; 175: 1227-1234.

Yang Y, Zhou F, Fang Z, Wang L, Li Z, Sun L, Wang C, Yao W, Cai X, Jin J, Zha X. Post-transcriptional and post-translational regulation of PTEN by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biochem.* 2009; 106: 1102-1112.

Yang L, Krefting I, Gorovets A, Marzella L, Kaiser J, Boucher R, Rieves D. Nephrogenic systemic fibrosis and class labeling of gadolinium-based contrast agents by the Food and Drug Administration. *Radiology.* 2012; 265: 248-253.

Yerram P, Saab G, Karuparthi PR, Hayden MR, Khanna R. Nephrogenic systemic fibrosis: a mysterious disease in patients with renal failure-role of gadolinium-based contrast media in causation and the beneficial effect of intravenous sodium thiosulfate. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007; 2: 258-263.

Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron.* 1986; 44: 230-234.

Yoshihara D, Kurahashi H, Morita M, Kugita M, Hiki Y, Aukema HM, Yamaguchi T, Calvet JP, Wallace DP, Nagao S. PPAR-gamma agonist ameliorates kidney and liver disease in an orthologous rat model of human autosomal recessive polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 300: 465-474.

Z

Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009; 19: 128-139.

Zhang D, Sun L, Xian W, Liu F, Ling G, Xiao L, Liu Y, Peng Y, Haruna Y, Kanwar YS. Low-dose paclitaxel ameliorates renal fibrosis in rat UUO model by inhibition of TGF-beta/Smad activity. *Lab Invest.* 2010; 90: 436-447.

Zhao C, Chen W, Yang L, Chen L, Stimpson SA, Diehl AM. PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 350: 385-391.

Zhou J, Zhong DW, Wang QW, Miao XY, Xu XD. Paclitaxel ameliorates fibrosis in hepatic stellate cells via inhibition of TGF-beta/Smad activity. *World J Gastroenterol.* 2010; 16: 3330-3334.

Zhuo Y, Zhang J, Laboy M, Lasky JA. Modulation of PDGF-C and PDGF-D expression during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286: L182-188.

Sites internet

Site internet 1 : Voies de signalisation de PDGF. Disponible à :

<https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=352>

Site internet 2 : L'imagerie par Résonance Magnétique - Notion de moment cinétique et magnétique. Disponible à :

http://www.afppesudest.net/irm_chp3.htm

Site internet 3 : Travaux Pratiques Encadrés : L'Imagerie par Résonance Médicale - Aymane TAFALI et Ambroise VEGAS. Disponible à :

<http://tpeirmlvh2013.e-monsite.com/pages/i-principe-fonctionnement-de-l-irm/la-rmn.html>

Site internet 4 : Groupe de recherche canadien sur la sclérodémie – Sclérodémies.

Disponible à : <http://www.csrg-grcs.com/sclerodermie.html>

ANNEXES

Annexe 1 : Mesure du temps de relaxation longitudinal T_1 au relaxomètre

Le temps de relaxation longitudinal T_1 est mesuré à l'aide d'un relaxomètre Minispec Bruker à champ fixe (60 MHz, qui correspond à 1,47 Tesla) et à 37°C.

La repousse du signal dans l'axe longitudinal (perpendiculaire à la bobine ; plan Oz) est appelée relaxation T_1 ou relaxation spin réseau.

Elle peut se mesurer par relaxométrie avec une séquence de type inversion / récupération. Le principe de cette dernière consiste en un basculement à 180° des spins des protons (et du vecteur M) afin d'obtenir une aimantation selon l'axe Oz inversée par rapport à l'orientation initiale du vecteur M puis, en une lecture de l'aimantation longitudinale à différents temps (t). Comme la lecture dans le plan perpendiculaire à la bobine n'est pas possible, on effectue un basculement des spins à 90° au moment de la lecture. Il est ensuite nécessaire d'attendre la repousse complète de l'aimantation (temps appelé RD qui doit être au moins 5 fois supérieur au temps T_1 et inférieur à 10 fois le T_1) avant de reproduire une inversion à 180° et d'attendre un temps t plus long pour faire une nouvelle mesure.

Le schéma de la séquence apparaît dans la **Figure 119** suivante :

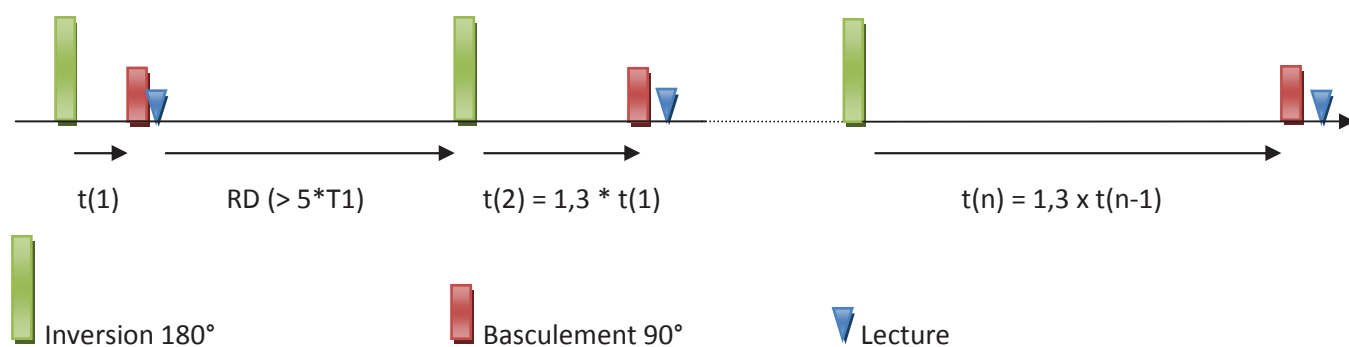


Figure 119 : Séquence inversion/récupération utilisée pour mesure du T_1 au relaxomètre

Cette croissance exponentielle est régie par l'équation $M_z(t) = M_0 (1 - 2\exp^{-t/T_1})$.

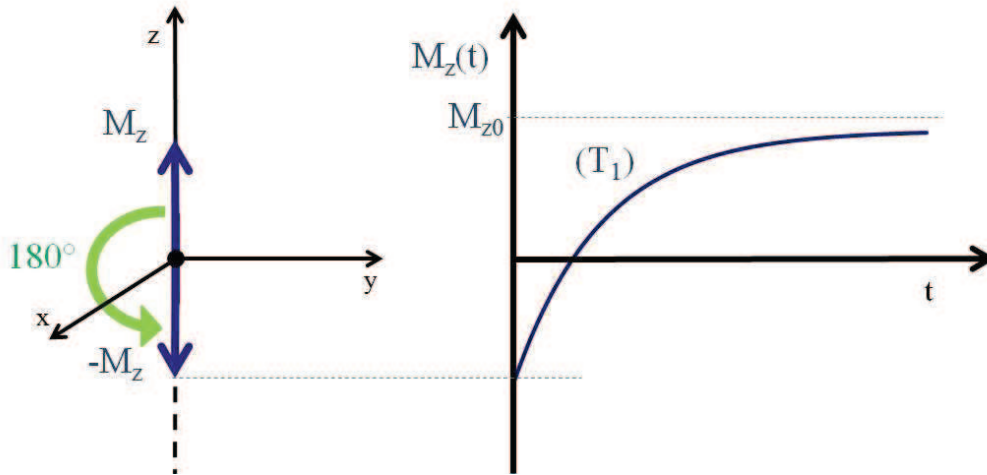


Figure 120 : Relaxation longitudinale et détermination du T_1

Le T_1 calculé à partir de l'équation ci-dessus est le temps nécessaire à une repousse de 67% de l'aimantation longitudinale.

Le T_1 observé est le résultat de deux contributions d'origines différentes : une origine paramagnétique (due au produit) et une diamagnétique (due à la matrice). Le T_1 observé (T_{1obs}) se définit donc comme :






$$\text{Équation 9 : } \frac{1}{T_{1obs}} = \frac{1}{T_{1para}} + \frac{1}{T_{1dia}}$$







La vitesse de relaxation longitudinale R_1 qui nous intéresse est donc le R_1 paramagnétique et se définit comme :


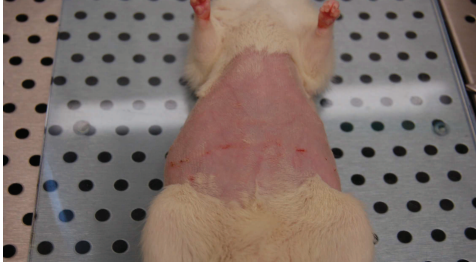



$$\text{Équation 10 : } R_{1para} = \frac{1}{T_{1para}} = \frac{1}{T_{1obs}} - \frac{1}{T_{1dia}}$$

Annexe 2 : Score clinique

Nous avons établi un système de score clinique (**Figure 121**) afin de suivre l'évolution clinique des animaux. Il repose sur l'examen des lésions (type, nombre, forme, localisation), la repousse et l'aspect du poil ainsi que sur la présence ou non d'un pli cutané. Ce score est pondéré en faveur des lésions cutanées, critère qui nous semble cliniquement plus pertinent que les autres critères évalués.

Critères cliniques	Description	Score	Photos
Lésions	Absence	0	
	Cicatrisées	2	
	Croûteuses	4	
	« Rouges »	6	
Nombre des lésions	2 > x < 5	2	

	+	4	
	++	6	
	+++	8	
Forme des lésions	Isolées	1	
	Punctiformes	2	
	Regroupées	3	

Localisation des lésions	Dos	1	
	Abdomen	1	
	Flanc	1	
	Dos + abdomen	2	
	Dos + flanc	2	
	Abdomen + flanc	2	
	Dos + abdomen + flanc	3	
	Repousse du poil	Normale	0
Partielle		1	
Aucune		2	






Aspect du poil	Normal	0	
	Terne et/ou rêche	1	
Pli cutané persistant	Absent	0	
	Léger	1	
	Très marqué	2	

Figure 121 : Score clinique établi en interne pour le suivi clinique des animaux

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Fibroblaste dermique de Rat, observé par microscopie électronique à transmission (x2600) (Haylor et coll., 2012).....	21
Figure 2 : Phénotype des fibroblastes, fibrocytes et myofibroblastes (Sorell et Caplan, 2009)	23
Figure 3 : Synthèse du collagène (Pariante et coll., 2005)	25
Figure 4 : Etapes de la fibrose (Wynn, 2007)	26
Figure 5 : Modèles de mécanisme de la fibrose (d'après Hergoz, 2012)	28
Figure 6 : Fonctions de TGF β dans la fibrose (Verrecchia et Mauviel, 2007).....	30
Figure 7 : Structure du Latent TGF β (LTGF β) (Rifkin, 2005)	31
Figure 8 : Voies de signalisation de TGF β (Akhurst et Hata, 2012)	32
Figure 9 : Voie de signalisation de TGF β SMAD-dépendante (Verrecchia, 2011)	33
Figure 10 : Rôle inhibiteur de TNF α dans la régulation de l'expression de COL1A2 (D'après Verrecchia, 2011) .	34
Figure 11 : Voie PI3K/AKT induite par TGF β (Zhang, 2009).....	35
Figure 12 : Voie de signalisation MEK/ERK induite par TGF β (Zhang, 2009).....	36
Figure 13 : Fonction inhibitrice par CTGF de SMAD 7 (Wahab et coll., 2007).....	37
Figure 14 : Voies de signalisation de PDGF (site internet 1)	39
Figure 15 : Macrophages de type M1 et M2 (Laskin, 2009).....	41
Figure 16 : Fonctions d'IL-13 (Wynn, 2003)	42
Figure 17 : Fonction d'ET-1 dans la fibrose (Ross et coll., 2010).....	44
Figure 18 : Voie de signalisation de PPAR γ SMAD-dépendante (Gosh et coll., 2004).....	47
Figure 19 : Voie de signalisation de PPAR γ SMAD indépendante (Kulkarni et coll., 2011)	47
Figure 20 : Rôle d'Egr-1 dans la fibrose (Battacharyya et coll., 2011a).....	49
Figure 21 : Hypothèses du rôle d'Egr-2 dans la fibrose induite par TGF β (Fang et coll., 2011)	49
Figure 22 : Voie de signalisation inhibée par PTEN	50
Figure 23 : Voie de signalisation Wnt (Königshoff et Eickelberg, 2010).....	52
Figure 24 : Voie de régulation de Fli1 par TGF β (Asano et coll., 2010)	54
Figure 25 : Conséquences d'un manque de Fli1 dans la fibrose cutanée (SSc) (Asano et coll., 2010).....	55
Figure 26 : Rôle central des PPRs dont les TLRs (Huebenera et Schwabea, 2012)	57
Figure 27 : Voies possibles d'activation des myofibroblastes (modifié à partir de Kisseleva 2008)	58
Figure 28 : Principales voies de signalisation impliquées dans la TEM (Pallet et Anglicheau 2008).....	60
Figure 29 : Différenciation des fibrocytes (Bucala, 2012)	61
Figure 30 : Représentation schématique des différentes approches thérapeutiques associées à l'inhibition de la voie du TGF β (Akhurst et Hata, 2012).....	63
Figure 31 : Effet de l'imatinib sur la voie Fli1 (Asano et coll., 2010)	64

Figure 32 : Notion de moment cinétique et magnétique (site internet 2) :	67
Figure 33 : Orientation des protons (site internet 3) :	68
Figure 34 : Répartition des protons dans le plan parallèle ou antiparallèle sous un champ magnétique B_0 de 0,5 Tesla (Kastler et coll., 1994)	68
Figure 35 : Caractéristiques vectorielles de l'aimantation microscopique (μ) et macroscopique (M) (Dillenseger et Moerschel, 2009)	69
Figure 36 : Soumis à un champ magnétique B_0 , chaque proton décrit un cône autour de B_0 , comme le ferait une toupie (site internet 3).	69
Figure 37 : Effet d'une impulsion RF de 90° sur le vecteur d'aimantation macroscopique M et sur les transitions d'énergie des spins (Dillenseger et Moerschel, 2009)	70
Figure 38 : Relaxation T1, repousse de l'aimantation longitudinale (Dillenseger et Moerschel, 2009)	71
Figure 39 : Relaxation T2, Décroissance de l'aimantation transversale (Dillenseger et Moerschel, 2009)	72
Figure 40 : Coupes IRM axiales du cerveau pondérées en T1, avant (pré) et après (post) injection d'acide gadotérique. Détection d'un lymphome (\rightarrow) (Source : images internes Guerbet).....	72
Figure 41 : Effets T1 et T2 des agents de contraste (Laurent et coll., 2009)	75
Figure 42 : Mécanisme de la sphère interne (A) et de la sphère externe (B) (Laurent et coll., 2009)	75
Figure 43 : Structure moléculaire des complexes de gadolinium commercialisés à ce jour (d'après Port et coll. 2008)	77
Figure 44 : Constante de relaxivité r_1 définie par la vitesse de relaxation (R_1) normalisée par sa concentration en Gd ([Gd]).....	82
Figure 45 : Représentation graphique du Log K_{cond} (pH physiologique).....	84
Figure 46 : Représentation graphique de la demi-vie des complexes ($T_{1/2}$, pH 1,0, 25°C).....	86
Figure 47 : Modélisation de la concentration de gadolinium libre libéré par les CGs de différentes stabilités thermodynamique et cinétique (Idée et coll., 2009)	87
Figure 48 : Aspects cliniques de la FSN (d'après Girardi et coll., 2011)	92
Figure 49 : Aspects systémiques de la FSN (d'après Cowper et coll., 2008 et Girardi et coll., 2011)	93
Figure 50 : Grille permettant le diagnostic de la FSN (traduit à partir de Girardi et coll., 2011).	94
Figure 51 : Examen histopathologique de la FSN (d'après Girardi et coll., 2011).	97
Figure 52 : Aspects cliniques et histopathologiques de la sclérodémie (Gabrielli et coll., 2009)	100
Figure 53 : Suivi de l'épaisseur de la peau (score de Rodnan modifié : A et B) et de la flexion du genou (degré de contracture, mesuré au goniomètre) (C et D) au cours du traitement à l'imatinib chez deux patients (patient 1 : A et C ; patient 2 : B et D) atteints de FSN (d'après Kay et High 2008).	104
Figure 54 : Dépôts cutanés de Gd dans des fibroblastes ou des macrophages chez des patients souffrant de FSN (par microscopie électronique à transmission) (Thakral et Abraham, 2009)	107
Figure 55 : Carte des concentrations de Gd (par spectroscopie de fluorescence RX) et des zones de fibrose (coloration H&E) (d'après High et coll., 2010).	108
Figure 56 : Répartition (en pourcentage) des cas de FSN chez les insuffisants rénaux (selon Cowper 2011-2009)	114

Figure 57 : Concentration plasmatique de Gd total en fonction du temps après injection de 0,1 mmol/kg d'acide gadotérique chez des volontaires sains (o) ou des sujets insuffisants rénaux avec une clairance de la créatinine entre 30-60 mL/min (*) ou comprise entre 10-30 mL/min (+) (Chachuat et coll., 1992)	115
Figure 58 : Concentration plasmatique de calcium et de phosphate chez des patients souffrant de FSN ou uniquement insuffisants rénaux (Marckmann et coll., 2007)	116
Figure 59 : Méthodologie de l'étude Pro-FINEST (Amet et coll., 2012b)	125
Figure 60 : Libération de Gd ³⁺ dissocié (dosage par LC-ICP-MS) après incubation de 1 mM de différents CGs dans du sérum humain à 37°C pendant 15 jours en présence (B et D) ou non (A et C) de 10 mM de phosphate (Frenzel et coll., 2008).....	126
Figure 61 : Mécanisme spéculatif impliquant la capture de gadolinium insoluble par des macrophages puis l'attraction de fibrocytes circulants, en présence de facteurs de risque, dont l'inflammation (Perazella, 2008) (Cyto = cytokines, cF = fibrocytes circulants)	127
Figure 62 : Fibrillogénèse induite par les lanthanides : fixation des lanthanides à la partie hélicoïdale du collagène (Stratta et coll., 2008)	128
Figure 63 : Représentation schématique des diverses hypothèses mécanistiques du développement de la FSN présentées dans la littérature	129
Figure 64 : Suivi du rapport entre la valeur de R ₁ par rapport à celle mesurée à T ₀ , pour 3 différents CGs dans du plasma de Rat, par relaxométrie (60 MHz) pendant 48 heures.....	137
Figure 65 : Suivi du rapport entre la valeur de R ₁ par rapport à celle mesurée à T ₀ du gadodiamide dans du plasma de Rat ajusté ou non à 10 mM de phosphate, par relaxométrie (60 MHz) pendant 24 heures.....	137
Figure 66 : Suivi du rapport entre la valeur de R ₁ par rapport à celle mesurée à T ₀ du gadodiamide dans du plasma ou du sérum de Rat ajusté ou non à 10 mM de phosphate, par relaxométrie (60 MHz) pendant 24 heures	138
Figure 67 : Suivi du rapport entre la valeur de R ₁ par rapport à celle mesurée à T ₀ de différents CGs et de l'acétate de Gd dans du séronorm ajusté ou non à 10 mM de phosphate, par relaxométrie (60 MHz) pendant 360 heures	139
Figure 68 : Suivi du rapport entre la valeur de R ₁ par rapport à celle mesurée à T ₀ du gadodiamide dans du sérum humain ou séronorm ajustés ou non à 10 mM de phosphate, par relaxométrie (60 MHz) pendant 360 heures (α : observation d'une évaporation de l'échantillon).....	141
Figure 69 : Suivi du rapport entre la valeur de R ₁ par rapport à celle mesurée à T ₀ du gadodiamide dans du plasma de Rat après ultracentrifugation ou non, par relaxométrie (60 MHz) pendant 24 heures	142
Figure 70 : Suivi du rapport entre la valeur de R ₁ par rapport à celle mesurée à T ₀ de l'acétate de Gd dans du plasma de Rat après ultracentrifugation ou non, par relaxométrie (60 MHz) pendant 24 heures	142
Figure 71 : Synoptique de l'étude	202
Figure 72 : Protocole de l'étude.....	203
Figure 73: Evolution pondérale des différents groupes. Groupe 3 vs. autres traitements : p<0.05 (*)	207
Figure 74 : Evolution du score clinique moyen par groupe, en fonction des traitements reçus entre J7 et J11 et du type de régime alimentaire reçu (groupes 1, 2, 4 et 5 : régime enrichi en adénine jusqu'à J21).	208
Figure 75 : Evolution du score clinique global individuel des rats du groupe 4 : régime enrichi en adénine jusqu'à J21 et administration de gadodiamide (n = 15).	208

Figure 76 : Exemple d'analyse histologique (colorations HES et rouge sirius) de la peau dorsale du rat 24, ayant reçu du gadodiamide et un régime enrichi en adénine. La coloration au Rouge sirius fait apparaître la présence de collagène dans le derme (grossissement x 2,5)	209
Figure 77 : Evolution des érythrocytes en fonction des différents traitements administrés entre J7 et J11 et de la nourriture reçue pendant les trois premières semaines (Non Significatif, NS)	210
Figure 78 : Evolution du taux d'hématocrite en fonction des traitements et de l'alimentation reçue pendant les 3 premières semaines de l'étude (groupes 1, 2, 4 et 5 : $p < 0,001$ (***) J0 vs. J32).....	210
Figure 79 : Evolution de hémoglobininémie en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude, J0 à J21, (groupes 1, 2, 4 et 5 : $p < 0,001$ (***) J0 vs. J32).	211
Figure 80 : Evolution de la créatininémie en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude (J0 à J21) ; Groupe 3 (gadodiamide, régime standard) = $p < 0.01$ (**) vs. tous les groupes à J21 et à J32.	212
Figure 81 : Evolution de la sidérémie en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude.....	213
Figure 82 : Evolution de la sidérémie des rats de la série 3 en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 (prélèvement à J22 au lieu de J21)	213
Figure 83 : Evolution de la phosphatémie en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude.....	214
Figure 84 : Evolution de la phosphatémie des rats de la série 3 en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 (prélèvement à J22).....	214
Figure 85 : Corrélation linéaire positive entre la concentration de créatinine plasmatique et la phosphatémie à J21 (séries 1 et 2).	215
Figure 86 : Concentration de gadolinium total dans la peau par groupe en fonction des traitements administrés entre J7 et J11 et du régime alimentaire reçu pendant les trois premières semaines de l'étude ; Groupe 4 = $p < 0.001$ (***) vs. tous les groupes.....	215
Figure 87 : Evolution temporelle de la constante de relaxivité r_1 dans la peau dans le temps en fonction du complexe de gadolinium (administré entre J7 et J1) ainsi que du régime alimentaire reçu jusqu'à J21.....	216
Figure 88 : Evolution de la phosphatémie (uniquement séries 1 et 2) en fonction de la présence de lésions macroscopiques au sein du groupe 4 ayant reçu le gadodiamide de J7 à J11 et un régime alimentaire enrichi en adénine de J0 à J21.	217
Figure 89 : Corrélation linéaire positive entre le score clinique et la phosphatémie à J21 (séries 1 et 2, $n = 5$). 217	
Figure 90 : Concentration de gadolinium total dans la peau à J32 en fonction de la présence ou de l'absence de lésions au sein du groupe 4 ayant reçu du gadodiamide de J7 à J11 et un régime enrichi en adénine de J0 à J21.	217
Figure 91 : Corrélation linéaire positive entre le score clinique et la concentration de Gd total dans la peau dorsale à J32.....	218
Figure 92 : Concentration de gadolinium total dans la peau à J21 ou J22 en fonction de la présence ou de l'absence de lésions au sein du groupe 4 ayant reçu du gadodiamide de J7 à J11 et un régime enrichi en adénine de J0 à J21	218
Figure 93 : Corrélation linéaire positive entre le score clinique et la concentration de Gd total dans la peau dorsale à J21 ou J22.	218

Figure 94 : Synoptique de l'étude	223
Figure 95 : Examen macroscopique du rat 27 (groupe 4, gadodiamide et paclitaxel).....	227
Figure 96 : Evolution du score clinique global individuel du groupe recevant du gadodiamide (J7 à J11) et du paclitaxel (J36 à J49) (groupe 4).....	227
Figure 97 : Evolution du score clinique global individuel du groupe recevant du gadodiamide (J7 à J11) et du DMSO (J36 à J53) (groupe 3).....	228
Figure 98 : Cellularité dans le derme des rats, évaluée à J7 (avant injection du NaCl 0,9% ou du gadodiamide), J36 (avant administration de DMSO ou de paclitaxel) ou J58 (sacrifice) par groupe.	229
Figure 99 : Cellularité dans le derme des rats, évaluée à J7, J36 et J58. Résultats des groupes 1 et 2 regroupés (NaCl 0,9%) et des groupes 3 et 4 regroupés (gadodiamide).....	229
Figure 100 : Immunohistochimie de la peau dorsale à J36 (avant traitement paclitaxel ou DMSO) et J58 (sacrifice) avec un anticorps anti-TGF β et un anticorps anti-P-SMAD 3	231
Figure 101 : Pourcentage de neutrophiles dans le sang, évalué avant (J36) et après traitement (J58) au DMSO ou paclitaxel ($p < 0,05$ (*)).....	232
Figure 102 : Evolution de la créatinine plasmatique en fonction des traitements	232
Figure 103 : Concentration de Gd total dans la peau dorsale à J36 (avant administration de DMSO ou de paclitaxel) et J58 (sacrifice)	233
Figure 104 : Concentration de Gd total tissulaire à J58 (sacrifice).....	233
Figure 105 : Synoptique de l'étude	235
Figure 106 : Evolution de la créatinine plasmatique en fonction des traitements ($p < 0,01$ (**) vs. J0 et $p < 0,001$ (***) vs. J0) (étude 2).....	237
Figure 107 : Evolution du score clinique global individuel des rats ayant reçu du gadodiamide et du paclitaxel (groupe 4).....	238
Figure 108 : Evolution du score clinique global individuel des rats ayant reçu du gadodiamide et du DMSO (groupe 3).....	238
Figure 109 : Corrélation positive entre la concentration de créatinine plasmatique et le score clinique à J18 (1 ^{er} jour des administrations de paclitaxel ou de DMSO) chez les rats ayant reçu du gadodiamide	239
Figure 110 : Coupes histologiques (coloration HES ; x10) et immunohistochimie (anti-TGF β ; x20) de la peau dorsale à J18 (avant traitement paclitaxel ou DMSO) et à J32 (sacrifice).....	242
Figure 111 : Immunohistochimie (anti-TGF β , anti-CTFG, anti-PDGF ; x20) de la peau dorsale à J32 (sacrifice) dans les groupes 1 et 3.....	243
Figure 112 : Concentration de Gd total dans la peau dorsale.....	244
Figure 113 : Corrélation positive entre la concentration de Gd total dans la peau et la créatinémie à J18.....	244
Figure 114 : Corrélation positive entre la concentration de Gd total dans la peau et le score clinique à J18....	245
Figure 115 : Variation de l'énergie au cours de la formation des différentes entités chimiques formées après incubation de gadodiamide dans du sérum en présence d'une forte concentration de phosphate ou non.	254
Figure 116 : Effet de différents lanthanides sur la prolifération des fibroblastes humains en culture (Jenkins et coll., 2011).....	258

Figure 117 : Score semi-quantitatif des lésions histologiques (inflammation, fibrose) et de l'expression dermique de TGF β en fonction du score clinique déterminé chez des rats insuffisants rénaux ayant reçu le gadodiamide à deux délais d'évaluation (J18 et J32).....	269
Figure 118 : Mécanisme schématique de la fibrose systémique néphrogénique sur la base des données avérées	277
Figure 119 : Séquence inversion/récupération utilisée pour mesure du T ₁ au relaxomètre.....	325
Figure 120 : Relaxation longitudinale et détermination du T ₁	326
Figure 121 : Score clinique établi en interne pour suivi clinique des animaux	330

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Maladies pour lesquelles les concentrations élevées de CTGF circulant (mesurées par ELISA) sont corrélées à la sévérité de la fibrose (Leask et coll., 2009).....	37
Tableau 2 : Activités anti-fibrosantes des ligands PPAR- γ (Wei et coll., 2012)	46
Tableau 3 : Exemples de ligands de PPAR- γ (d'après Wei et coll., 2012).....	46
Tableau 4 : Médicaments présentant des propriétés anti-TGF β sur le marché, et indications cliniques (Varga et Pasche, 2009)	62
Tableau 5 : Etudes cliniques en cours investiguant des antagonistes des récepteurs au LPA (d'après Tager, 2012)	65
Tableau 6: Lanthanides (d'après Palinkas, 2012)	73
Tableau 7 : Formulation de la solution pharmaceutique des 5 CGs (d'après Idée et coll., 2006).....	78
Tableau 8 : Disponibilité des CGs en fonction des pays (d'après Runge et coll. 2011)	79
Tableau 9 : Osmolalité et charge osmotique des différents CGs (d'après Port et coll., 2008)	80
Tableau 10 : Viscosité des solutions pharmaceutiques des CGs (d'après Port et coll., 2008)	81
Tableau 11 : Constantes de relaxivité r_1 et r_2 des CGs dans l'eau, à 37°C et à 1,5 Tesla (d'après Port et coll., 2008)	82
Tableau 12 : Constantes de relaxivité r_1 et r_2 des CGs dans le plasma bovin, à 37°C et à 1,5 Tesla (d'après Rohrer et coll., 2005)	83
Tableau 13 : Constantes de stabilité thermodynamique (Log K_{therm}) et conditionnelle (Log K_{cond}) (d'après Port et coll., 2008).....	84
Tableau 14 : Demi-vie de dissociation de tous les complexes de gadolinium, étudiés dans des conditions strictement identiques, à pH 1,0 et à 25°C (d'après Port et coll., 2008).....	85
Tableau 15 : Stabilité thermodynamique (Log K_{therm} ou Log K_{cond}) de différents complexes métalliques (d'après Port et coll., 2008).....	88
Tableau 16 : Analyses biologiques utiles (Knopp et Cowper, 2008)	94
Tableau 17 : Critères cliniques et histopathologiques pour la détermination du score (d'après Girardi et coll., 2011).	95
Tableau 18 : Documentation de l'exposition au gadolinium (Girardi et coll., 2011).	98
Tableau 19 : Effets de la transplantation rénale chez des patients atteints de FSN HD : hémodialyse ; PD : dialyse péritonéale.....	102
Tableau 20 : Cas de patients atteints de FSN ayant reçu un traitement par photophérèse extracorporelle (d'après Linfert et coll., 2008).....	103
Tableau 21 : Exemples d'autres traitements testés chez des patients souffrant de FSN	105
Tableau 22 : Nombre de cas de FSN « purs » rapportés par l'EMA (2010) et par Pirovano (2012).....	110
Tableau 23 : Dose cumulée moyenne de gadodiamide chez les patients souffrant de FSN (*p < 0,02 vs. cas sévères ; **p<0,01 vs. cas sévères) (Marckmann et coll., 2007). IRC : insuffisance rénale chronique	111
Tableau 24 : Classification de l'insuffisance rénale chronique d'après les recommandations KDOQI (2002)....	112

Tableau 25 : Délai entre la dialyse et l'injection du CG chez des patients ayant développé une FSN ou non (d'après Prince et coll., 2008)	115
Tableau 26 : Cofacteurs associés à la FSN suggérés dans la littérature.	119
Tableau 27 : Recommandations du CHMP pour les différents produits de contraste à base de gadolinium (EMA, 2010)	122
Tableau 28 : Recommandations de la FDA de 2006 à 2010 pour les différents produits de contraste à base de gadolinium (Reiter et coll., 2012).....	123
Tableau 29 : Produits utilisés	135
Tableau 30 : Matrices utilisées.....	135
Tableau 31 : Comparaison des concentrations sériques de différents analytes entre le séronorm et sérum de Rat (Rats Wistar et SD) (↔ : concentrations équivalentes, ∩ : concentration de l'analyte légèrement inférieure chez l'Homme, ∪ : concentration plus faible chez l'Homme, ↑ ; concentration plus importante chez l'Homme, ↑↑ : concentrations très augmentée chez l'Homme vs. celle du Rat) (N/D : non déterminé)	140
Tableau 32 : Concentration plasmatique de différents paramètres plasmatiques avant et après ultracentrifugation	141
Tableau 33 : Groupes et produits injectés	202
Tableau 34 : Signes cliniques.....	204
Tableau 35 : Paramètres étudiés	206
Tableau 36 : Groupes et produits injectés (DMSO : Diméthylsulfoxyde).....	222
Tableau 37 : Paramètres étudiés	225
Tableau 38 : Nombre d'animaux présentant des lésions cutanées macroscopiques (si supérieures à 2 lésions) et évaluation semi-quantitative des différents paramètres histologiques et immunohistochimiques de la peau dorsale avant (J36) et après (J58) les administrations de DMSO ou de paclitaxel (+ faible, ++ modéré, +++ important).....	230
Tableau 39 : Groupes et produits injectés	235
Tableau 40 : Paramètres étudiés lors de l'étude	236
Tableau 41 : Nombre d'animaux présentant des lésions cutanées macroscopiques (si supérieures à 2 lésions) et évaluation semi-quantitative des différents paramètres histologiques et immunohistochimiques de la peau dorsale avant (J18), pendant (J25) et après (J32) les administrations de DMSO ou de Paclitaxel (+ faible, ++ modéré, +++ important).....	241
Tableau 42 : Précipitation de 0,01 mM de quatre Ln (Ce, Y, Yb, Tm) dans différents milieux à pH 7,3-7,4 (Kanapilly 1980). L'ultrafiltrat synthétique de sérum (SUF) est composé de : chlorure de sodium, chlorure d'ammonium, glycine, cystéine, sulfate, bicarbonate de sodium, citrate trisodique, dihydrogénophosphate de sodium, chlorure de calcium et d'un antibactérien.	251