

Université du Droit et de la Santé – Lille 2  
Ecole Doctorale Biologie – Santé de Lille

*N° attribué par la bibliothèque*

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**THESE**

Pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2  
*Discipline* : Sciences Physico-chimiques et Technologies Pharmaceutiques

Présentée et soutenue publiquement par :

**Maya KROUBI**

(*Épouse* : **AHMED OUAMER**)

Le 21/12/2010

**Développement de formulations colloïdales antiparasitaires  
pour traiter la Trypanosomose Africaine**

**Composition du jury :**

Rapporteurs : **Professeur Philippe LOISEAU** (Chatenay-Malabry)

**Docteur Gillian BARRATT** (Chatenay-Malabry)

Examineurs : **Docteur Hamadi KAREMBE** (Libourne)

**Professeur Philippe VINCENDEAU** (Bordeaux)

**Professeur Régis MATRAN** (Lille)

Directeur de thèse : **Professeur Didier BETBEDER** (Lille)

Travaux effectués au sein de l'équipe EA2689, IFR 114 IMPRT, Faculté de Médecine, Pôle recherche,  
Département de physiologie, 1 place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

## **Développement de formulations colloïdales antiparasitaires pour traiter la Trypanosomose Africaine**

---

### **RESUME**

Cette thèse porte sur le développement d'une formulation colloïdale à base de polysaccharide (NP<sup>+</sup>) d'une molécule pharmaceutique fragile, le diminazène (DMZ), en vue d'améliorer son efficacité thérapeutique dans le traitement de la Trypanosomose Africaine sous sa forme animale, voire humaine. Nous avons étudié dans un premier temps le procédé de chargement des NP<sup>+</sup> en DMZ base. Il a été constaté que l'ajout de phospholipides dans la matrice des NP<sup>+</sup> représente le facteur limitant l'indice de saturation des NP<sup>+</sup> en DMZ. Lors de son chargement, le procédé choisi est le « *post-loading* » afin de ne pas dégrader le principe actif. Il correspond à un mode opératoire en conditions douces : ajout d'une solution de DMZ dans une suspension de NP<sup>+</sup> à cœur huileux. Nos résultats montrent que cette formulation reste stable durant 6 mois à 4°C ne libérant pas de DMZ et le protégeant de l'oxydation. Dans un second temps, nous avons évalué l'efficacité thérapeutique du DMZ formulé. Les tests *in vitro* sur *Trypanosoma brucei brucei* montrent une amélioration de l'activité trypanocide du DMZ. Les tests réalisés sur un modèle aigu de Trypanosomose Africaine, ont mis en évidence que la dose efficace de la formulation colloïdale de DMZ est de 3 mg/kg.

Mots clefs: diminazène, Trypanosomose Africaine, formulation nanoparticulaire, taux d'association, oxydation du médicament, efficacité thérapeutique

---

### **ABSTRACT**

This thesis focuses on the development of a colloidal formulation of diminazene (DMZ) using cationic polysaccharide nanoparticles (NP<sup>+</sup>) for the treatment of African Animal Trypanosomiasis or Human African Trypanosomiasis.

We first studied the process of DMZ loading in NP<sup>+</sup>. The addition of phospholipids (DG) in the matrix of the NP<sup>+</sup> appeared to be necessary for the DMZ association. So, the amount of DG is the limiting factor of the saturation index of NP<sup>+</sup> with DMZ. To avoid the drug degradation during its formulation, we choose the "*post-loading*" technique which corresponds to a procedure with mild conditions: adding a DMZ solution in a suspension of NP<sup>+</sup> containing an oily core (DGNP<sup>+</sup>). DMZ loaded into DGNP<sup>+</sup> was found to be protected against oxidation and was stable for at least 6 months at 4°C. In a second step, we evaluated the therapeutic efficacy of formulated DMZ. *In vitro* tests on *Trypanosoma brucei brucei* showed an improvement of the DMZ trypanocidal activity. Tests on an acute model of African Trypanosomiasis showed that the effective dose is at the dose of 3 mg/kg.

Key words: diminazene, African Trypanosomiasis, nanoparticulate formulation, drug oxidation, entrapment efficiency, therapeutic efficacy

*Je dédie cette thèse :*

*A mes parents qui m'ont toujours soutenue et sans qui je n'aurai pu faire  
tout ce chemin*

*A mes frères, ma sœur Faticia et à mon mari Kamel qui ont toujours  
cru en moi*

*A mes amis*

...

## REMERCIEMENTS

---

➤ **A Monsieur le Professeur Didier BETBEDER**

*Pour m'avoir accueillie dans votre équipe de Vectorisation de Médicaments, il y a maintenant quelques années, pour avoir été mon tuteur en Master 1, en Master 2, puis mon directeur de thèse. J'ai grandement apprécié la confiance que vous m'avez accordée et à l'investissement que vous avez apporté à nos travaux.*

*Je tiens à témoigner de ma sincère gratitude à tous les membres du jury pour avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail.*

*Et plus spécialement :*

- *Au Docteur Gillian BARRATT, Directeur de recherche du Laboratoire de Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie, UMR CNRS 8612, IFR 141, Châtenay-Malabry*
- *Au Professeur Philippe LOISEAU, du Laboratoire Chimie des Substances Naturelles et Chimiothérapie Antiparasitaire, UMR CNRS 8076, IFR 141, Châtenay-Malabry*

*Qui m'ont fait l'honneur d'être mes rapporteurs de thèse.*

➤ **A Monsieur le Professeur Régis MATRAN,**

*Directeur du Laboratoire EA2689, IFR114*

*et Vice-président du Conseil Scientifique de l'Université Lille 2*

*Que je remercie très vivement de m'avoir accueillie dans son laboratoire où j'ai pu préparer ma thèse. Merci aussi, pour ses encouragements réguliers.*

➤ **A Monsieur le Docteur Hamadi KAREMBE,**

*Responsable des Affaires Réglementaires de la Zone Internationale*

*de la Société CEVA Santé Animale et Coordinateur Scientifique*

*du travail effectué sur les formulations colloïdales de médicaments antiparasitaires*

*Pour votre encadrement actif dans ce travail et pour vos conseils. Je garde en mémoire l'enthousiasme dont vous avez toujours fait preuve durant nos nombreuses réunions téléphoniques.*

➤ **La Société CEVA Santé Animale**

*Pour leur soutien financier et juridique.*

➤ **A Madame le Docteur Anne WAWREZINIECK,**  
*Chef de Projet Formulation*

*de la Société CEVA Santé Animale, durant l'année 2009*

*Pour avoir apporté son œil extérieur au projet, ce qui a beaucoup aidé son avancement.*

➤ **A Monsieur Le Professeur Philippe VINCENDEAU,**

*du Laboratoire Biologie et Parasitologie, EA3677, Université Victor Segalen Bordeaux 2*

*Pour avoir permis la réalisation des tests in vitro et in vivo des formulations nanoparticulaires antiparasitaires au sein de son laboratoire.*

➤ **A Mesdames les Docteurs Maria MAMANI-MATSUDA & Tina KAUSS,**

*du Laboratoire de Chimie Analytique de l'Université Bordeaux 2 (Faculté de pharmacie)*

*Pour avoir validé les protocoles de dosages HPLC du diminazène et de la rutine.*

➤ **A Monsieur le professeur Michel LHERMITTE**

**& à Madame le Docteur Nicole HOUDRET,**

*Responsables du Service Toxicologie du Centre de Biologie Pathologie au CHRU de Lille*

*Pour m'avoir apporté un encadrement idyllique pour effectuer des analyses HPLC et de Chromatographie Phase Gaz.*

➤ *Aux Techniciens du Laboratoire de Toxicologie du Centre de Biologie Pathologie, tout particulièrement à **Delphine ROUSSELLE, Jérémy, Gérard, Patric, Line ...***

*Qui m'ont apporté un soutien moral à chaque fois que je les ai rencontrés.*

➤ **A Monsieur le Professeur Jean-Marie AUBRY**

**& Monsieur Thibault LESEUR**

*du Laboratoire « Oxydation et Formulation »*

*de l'Université des Sciences et Technologie de Lille 1, Bâtiment C6*

*Qui m'ont accueillie avec gentillesse dans leur laboratoire afin d'utiliser leur NanoZS Malvern® au début de ma thèse.*

➤ **A Monsieur le Docteur Alexandre BARRAS** de l'Institut Pasteur de Lille

*Pour m'avoir permis d'effectuer de la CCM, de la RMN et de la Spectrométrie de Masse en mode Electrospray, mais également, pour avoir partagé ses connaissances. Je garderai un souvenir chaleureux de cette collaboration.*

➤ **A monsieur le Docteur Mike HOWSAM** du Centre Universitaire de Mesure et d'Analyse  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2

*Pour ses corrections des rapports écrits en anglais.*

➤ **A Monsieur le Docteur Christophe LANDRY** du Laboratoire de la Physiologie de la  
Barrière Hémato-Encéphalique à la Faculté des Science à Lens (Université d'Artois)

*Pour m'avoir permis d'utiliser l'homogénéisateur à haute pression et l'appareil d'analyse de taille Beckman Coulter de son laboratoire.*

➤ **A Mademoiselle le Docteur Jiang CHANG**

**& Messieurs les Docteurs Archibald PAILLARD et Youssef JALLOULI**

*Mes collègues et amis que j'ai vu évoluer de près et de loin, et qui n'ont jamais cessé de me témoigner leurs encouragements.*

➤ **A Mademoiselle le Docteur Chanez CHEMANI**

*Clin d'œil à cette amie, pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses discussions, ses remarques pertinentes et pour m'avoir régulièrement ramenée sur Terre.*

➤ **A Monsieur Michel TERRAY**, Directeur Marketing et Applications France  
de Malvern Instruments (Orsay)

*Pour ses conseils scientifiques dans le domaine de la caractérisation physico-chimique des nanoparticules et pour sa bonne compagnie durant les Journées Scientifiques du GTRV.*

➤ **Aux Docteurs en Biologie : Sidi HASSOUN, Hélène TIESSET-LOGEZ, Julien BUYCK,**  
**aux futurs Docteurs en Biologie : Christophe DOMBU, Rima ZIBOUCHE** et à toutes les  
personnes que j'ai côtoyées au laboratoire : **Pr. Benoit GUERY, Pr. Rémi NEVIÈRE, Dr. Karine**  
**FAURE, Dr. Eric KIPNIS, Dr. Steve LANCEL, Micheline, Danièle, Pascal, Marie-**  
**Dominique, Anne, Fayzat, Radha, Elodie, Jean-Baptiste, Cécile, Henry, Hélène, Emilie, ...**  
*Pour nos échanges scientifiques, nos bonnes parties de rigolades et pour s'être toujours montrés disponibles et chaleureux.*

➤ **A ma famille, mon mari et à tous mes amis**

*Encore merci à vous tous.*

## PUBLICATIONS

---

- **M. Kroubi**, H. Karembe, D. Betbeder: (Revue): *Drug delivery systems in the treatment of African Trypanosomiasis infections*. Expert Opinion on Drug Delivery, Mar 2011
- **M. Kroubi**, S. Daulouede, H. Karembe, Y. Jallouli, M. Howsam, D. Mossalayi, P. Vincendeau, D. Betbeder: *Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African trypanosomiasis*. Nanotechnology, 21 (50) : 505102-10, Nov 2010
- A. Paillard, C. Passirani, P. Saulnier, **M. Kroubi**, E. Garcion, J.P Benoît, and D. Betbeder: *Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers*. Pharmaceutical Research, 27 (1) : 126-133, Jan 2010

### Autres publications

- C.L. Dombu, **M. Kroubi**, R. Zibouche, R. Matran and D. Betbeder: *Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells*. Nanotechnology, Aug 2010
- J. Chang, Y. Jallouli, **M. Kroubi**, X.B. Yuan, W. Feng, C.S. Kang, P.Y. Pu, D. Betbeder: *Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier*. International Journal of Pharmaceutics, 379 (2) : 285-292, Sept 2009
- **M. Kroubi**, J. Buyck, R. Zibouche, R. Matran, D. Betbeder: *Evaluation of the cyto-adhesion and cyto-invasion mechanisms of cationic polysaccharidic nanoparticles on an in vitro model of human bronchial epithelium cells*. Revue des maladies respiratoires, 24 (9) : 1200, Nov 2007

## SOMMAIRE

---

➤ <b>ABREVIATIONS</b>	.....	(p1)
➤ <b>LISTE DES FIGURES &amp; TABLEAUX</b>	.....	(p3)
➤ <b>PREAMBULE</b>	.....	(p4)
➤ <b>INTRODUCTION</b>		
● <b><u>INTRODUCTION GENERALE</u></b>	.....	(p5)
● <b><i>Chapitre A</i> : <u>LA TRYPANOSOMOSE AFRICAINE</u></b>		
<b>I. Généralités</b>	.....	(p8)
<b>II. Taxonomie des trypanosomes</b>	.....	(p10)
II.1. La famille Trypanomastidae	.....	(p11)
II.2. La Trypanosomose Africaine Animale	.....	(p13)
II.3. La Trypanosomose Africaine Humaine	.....	(p13)
II.4. Physiologie des trypanosomes sous une forme trypomastigote sanguine	.....	(p14)
<b>III. Cycle de vie du trypanosome africain</b>	.....	(p24)
III.1. Un parasite hétéroxène	.....	(p24)
III.2. L'hôte intermédiaire	.....	(p25)
III.3. L'hôte définitif, symptômes induits	.....	(p25)
<b>IV. La pathogénicité des trypanosomes</b>	.....	(p27)
<b>V. Les stratégies de défense des trypanosomes</b>	.....	(p27)
V.1. La variation antigénique	.....	(p27)
V.2. Les facteurs circulants	.....	(p28)
● <b><i>Chapitre B</i> : <u>LES STRATEGIES PHARMACEUTIQUES</u></b>		
<b>I. Les chimiothérapies trypanocides</b>	.....	(p29)
I.1. Les traitements homologués	.....	(p29)
I.2. Les limites des chimiothérapies trypanocides	.....	(p38)
<b>II. Les Systèmes de Délivrance de Médicaments trypanocides</b>	.....	(p45)
<b>Revue: Drug Delivery Systems in the Treatment of African Trypanosomiasis Infection</b>		



➤ <b>RESULTATS</b>	
• <b>FORMULATION NANOPARTICULAIRE DE DIMINAZENE</b>	(p46)
<b>Article 1: Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African Trypanosomiasis</b>	
➤ <b>DISCUSSION</b>	(p50)
<b>I. Préparation et caractérisation des NP<sup>+</sup></b>	(p52)
<b>II. Formulation du DMZ dans des NP<sup>+</sup></b>	(p54)
II.1. Protocoles de séparation et d'analyse du DMZ-NP	(p54)
II.2. Facteurs limitant la formulation DMZ-NPL70	(p55)
II.3. Protection du DMZ des réactions de dégradation	(p57)
II.4. Le chargement maximal de DMZ des NPL70	(p57)
<b>III. Efficacité thérapeutique de la formulation DMZ-NPL70</b>	(p57)
<b>IV. Perspectives : Le franchissement des barrières biologiques</b>	(p58)
IV.1. La barrière sanguine	(p59)
IV.2. La barrière hémato-encéphalique	(p61)
IV.3. Le Ciblage intracellulaire du parasite	(p61)
➤ <b>CONCLUSION</b>	(p64)
➤ <b>ANNEXES</b>	
-1- <b>Les NP polysaccharidiques à cœur huileux</b>	
<b>Article 2: Positively-charged, Porous, Polysaccharide Nanoparticles loaded with Anionic Molecules behaves as 'Stealth' Cationic Nanocarriers</b>	(p65)
-2- <b>Protocole de préparation de NPL70 à l'aide de Solutol HS 15</b>	(p66)
➤ <b>BIBLIOGRAPHIE</b>	(p69)

## ABREVIATIONS

---

ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADN <sub>k</sub>	Acide DésoxyriboNucléique kinétoplastique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AVS	Antigène Variable de Surface ( <i>VSG : Variable Surface Glycoprotein</i> )
BHE	Barrière Hémato Encéphalitique ( <i>BBB : Blood Brain Barrier</i> )
CRAM	<i>Cystein-Rich Acidic integral Membrane protein</i>
Da	Dalton
DFMO	Di-Fluoro-Méthyl-Ornithine ou éflornithine
DMZ b	Diminazène base
DMZ diac	Diminazène diacéturate
DMZ diox	Diminazène dioxidé
DMZ monox	Diminazène mono-oxydé
DPPG	Di-palmitoyl-phosphatidyl-glycérol
ENTH	<i>Epsin N-terminal homology</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HMD	Homidium
HPHBR	<i>Haptoglobin-Haemoglobin Receptor</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
IgM	Immunoglobuline de type M
i.m.	intramusculaire
ISG	<i>Invariant Surface Glycoprotein</i>
ISM	Isométhamidium
i.v.	intraveineux
kpb	kilo paires de base
L.	<i>Leishmania</i>
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAO	MonoAmine Oxydase
MDR	<i>MultiDrug Resistance</i>
MLS	Méarsoprol
MRP	<i>MultiDrug resistance associated Proteins</i>
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH	forme réduite du coenzyme NADP <sup>+</sup>
NFT	Nifurtimox
NP	Nanoparticules
NP <sup>+</sup>	Nanoparticule(s) polysaccharidique(s) cationique(s)
NPL <sub>x</sub>	NP <sup>+</sup> contenant une composante lipidique

<b>NPL70</b>	Nanoparticule(s) polysaccharidique(s) cationique(s) lipidée(s) à 70% (poids/poids NP <sup>+</sup> / DPPG)
<b>OAT</b>	<i>Organic Anion Transporters</i>
<b>OATP</b>	<i>Organic Anion Transporting Peptides</i>
<b>ODC</b>	Ornithine décarboxylase
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé ( <i>WHO : World Health Organization</i> )
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Technique d'amplification d'ADN par réaction en chaîne par polymérase,)
<b>PF</b>	Poche Flagellaire
<b>P-gp</b>	P glycoprotéine
<b>PLA</b>	<i>Poly Lactic Acid</i>
<b>PLTA</b>	Programme de Lutte contre la Trypanosomose Africaine
<b>PTM</b>	Pentamidine
<b>QNP</b>	Quynapiramine
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygene Species</i>
<b>R<sup>r</sup>LDL</b>	Récepteur des LDL
<b>R<sup>r</sup>Tf</b>	Récepteur à la Transferrine
<b>sc</b>	sous-cutané
<b>SDM</b>	Système de Délivrance de Médicament ( <i>DDS : Drug Delivery System</i> )
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>SRA</b>	protéine Associée à la Résistance au Sérum humain
<b>SRE</b>	Système réticuloendothélial
<b>SRM</b>	Suramine
<b>T.</b>	<i>Trypanosoma</i>
<b>T. cong.</b>	<i>Trypanosoma congolense</i>
<b>T.b.</b>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<b>T.b. gamb.</b>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<b>T.b. rhod.</b>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<b>T.b.b.</b>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
<b>TA</b>	Trypanosomose Africaine
<b>TAA</b>	Trypanosomose Africaine Animale
<b>TAH</b>	Trypanosomose Africaine Humaine
<b>TbAT1</b>	<i>Trypanosoma brucei Adenosine Transporter 1</i>
<b>TDR</b>	<i>Tropical Diseases Research</i>
<b>Tf</b>	Transferrine
<b>TLF</b>	<i>Trypanosome Lytic Factor</i> (Facteur de Lyse des Trypanosomes)
<b>TMt</b>	Trypomastigote Métacyclique
<b>TSA</b>	Protéines thiol spécifiques anti-oxydant
<b>TSg</b>	Trypomastigote Sanguin

## LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

---

<b>Fig. 1 :</b> Distribution géographique de la Trypanosomose Africaine Humaine	(p 8)
<b>Fig. 2 :</b> Prise en charge de la Trypanosomose Africaine Humaine	(p 9)
<b>Fig. 3:</b> Classification des trypanosomes	(p 10)
<b>Fig. 4 :</b> Observations au microscope de frottis sanguins de patients atteints de la maladie de Chagas ( <i>T. cruzi</i> ) et de la Trypanosomose Africaine ( <i>T. brucei</i> )	(p 11)
<b>Fig. 5 :</b> Schéma de l'ultrastructure de trypanosomes du groupe <i>T. brucei</i> et <i>T. congolense</i> au stade trypomastigote sanguin (observations en microscopie électronique)	(p 15)
<b>Fig. 6 :</b> Section transversale de l'extrémité antérieure d'un <i>T.brucei</i> au stade Tsg	(p 16)
<b>Fig. 7 :</b> Architecture de la poche flagellaire	(p 19)
<b>Fig. 8 :</b> Composition lipidique de <i>T. brucei</i>	(p 23)
<b>Fig. 9 :</b> Cycle de vie de <i>T. brucei</i>	(p 24)
<b>Fig.10 :</b> Diagramme des événements expliquant le phénomène des vagues successives de parasitémie lors d'une infection à <i>T. brucei</i>	(p 28)
<b>Fig. 11 :</b> Schéma des structures moléculaires des médicaments homologués pour le traitement de la Trypanosomose Africaine	(p 30)
<b>Fig. 12:</b> Structure de la barrière hémato-encéphalique	(p 40)
<b>Fig. 13:</b> Schéma des cellules endothéliales qui forment la BHE et leur association avec les pieds astrocytaires	(p 42)
<b>Fig. 14 :</b> Ligands du transporteur membranaire TbAT <sub>1</sub> : adénine 6-aminopurine et la pentamidine	(p 43)
<b>Fig. 15 :</b> Ciblage passif d'un vecteur thérapeutique dans un macrophage pour traiter la Leishmaniose Viscérale	(p 60)
<b>Tableau 1 :</b> Protéome des trypanosomes	(p 17)
<b>Tableau 2 :</b> Indications des trypanocides curatifs de la TAA	(p 31)

## PREAMBULE

---

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de Recherche & Développement collaboratif Etat-Région Aquitaine, labellisé « **Projet Paravec** » par la société CEVA Santé Animale. Ce projet a impliqué plusieurs entreprises et laboratoires nationaux.

Au sein de l'équipe EA2689 de Lille, l'étude a consisté à développer une formulation nanoparticulaire chargée en diminazène (DMZ), un trypanocide efficace pour le traitement de la Trypanosomose Africaine Animale. L'intérêt majeur de ce nouveau système de délivrance de médicament est l'amélioration de l'efficacité thérapeutique du DMZ, en influençant sa biodistribution et en limitant sa toxicité.

Ce manuscrit est composé de quatre parties. Le Chapitre A décrit la pathologie induite par les trypanosomes africains. Le Chapitre B présente les différentes stratégies thérapeutiques et soulève la problématique de l'efficacité limitée des chimiothérapies mises sur le marché. Il comporte une revue dédiée aux systèmes de délivrance colloïdaux de trypanocides en cours de développement. La troisième partie décrit nos travaux basés sur l'optimisation d'une formulation nanoparticulaire originale de diminazène. Enfin, une discussion générale a été réalisée.

Les objectifs de ce travail de thèse furent :

- Développement d'un vecteur colloïdal de DMZ à administration parentérale pour traiter la trypanosomose africaine bovine
- Protéger le DMZ de ses réactions de dégradation
- Améliorer la biodisponibilité sanguine, lymphatique et cérébrale du DMZ
- Comparer l'efficacité thérapeutique de la formulation colloïdale avec celle de la formulation standard de DMZ diacéturate (Berenil®)

# INTRODUCTION

---

## INTRODUCTION GENERALE

---

« *Pour apprécier une science,  
Il faut connaître son passé* »

Auguste Comte

Durant des siècles, les hommes se sont sentis démunis face aux maladies infectieuses sans comprendre l'origine de ces maladies, vulgairement nommées pestes (du latin *pestis* « fléau »). C'est au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle que la Médecine et les Sciences du Médicament vont faire des progrès considérables grâce à plusieurs découvertes effectuées aux siècles précédents : la dissection (André Vésale 1514-1564), la circulation sanguine (William Harvey 1578-1657), le microscope (Antoine Van Leeuwenhoek 1632-1723), la vaccination (Edward Jenner 1749-1823) et les débuts de la microbiologie.

La microbiologie est mise à l'honneur par Louis Pasteur (1822-1895) qui réfute par la même occasion la théorie des générations spontanées, ancrée dans les manières de penser de l'époque. Une cause rationnelle est depuis accordée aux maladies infectieuses qui se caractérisent alors par la présence d'un agent causal, répondant au postulat de Koch (Robert Koch 1843-1910, prix Nobel médecine 1905). Il est présent chez tous les individus présentant l'infection, peut être isolé, cultivé, inoculé à un hôte sain, chez qui il reproduit la maladie, et peut être à nouveau isolé de l'individu malade.

De nos jours, les agents infectieux sont identifiés comme étant des bactéries, des virus, des champignons (pour les mycoses), des parasites (pour les parasitoses) ou des prions (particules protéiques infectieuses pour les encéphalopathies spongiformes transmissibles<sup>1</sup>). La transmission s'effectuent par voie respiratoire, sexuelle, muco-cutanée, digestive, ou sanguine; nécessitant parfois l'intervention d'un vecteur (ex. l'anophèle pour le paludisme).

---

<sup>1</sup> Induction d'une dégénérescence du système nerveux central liée à la propagation ou multiplication de prions

D'après les rapports de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies infectieuses sont responsables de plus de 14 millions de décès chaque année dans le monde affectant essentiellement les populations pauvres et marginalisées des pays du Sud (~ 90%) [1]. Leur dissémination est favorisée par une hygiène insuffisante, la malnutrition, un manque de prévention et un mauvais usage des traitements, sélectionnant des résistances aux agents anti-infectieux [2].

Peu d'infections sont strictement humaines, aussi, Wolfe N.D. et *al.*, [3] classent les agents pathogènes selon cinq niveaux d'évolution où un pathogène infectant exclusivement des animaux (niveau I) peut se transformer afin de devenir un agent pathogène exclusivement humain (niveau V). Les niveaux intermédiaires sont définis comme étant des zoonoses (du grec *zôon* « animal » et *nosos* « maladie »), des infections naturellement transmissibles de l'animal à l'humain et réciproquement [3, 4]. Plusieurs d'entre elles sont retenues dans des programmes d'actions prioritaires définis par des instituts de veille sanitaire à l'échelon national, voire internationale.

Nous avons été particulièrement sensibilisés par l'association de la FAO (l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) et l'OMS pour développer des programmes consacrés aux Trypanosomoses (1970). Cette association vise à sensibiliser la population mondiale au défi que représente la prise en charge de ces maladies infectieuses [5]. La Trypanosomose Africaine Humaine, en tant que maladie tropicale négligée fait depuis partie intégrante du programme spécial de recherche et de formation, le TDR (Tropical Diseases Research). Cette décision a permis de soutenir la recherche fondamentale et la mise en place d'équipes de recherche permanentes qui s'appliquent à innover dans les traitements prophylactiques et thérapeutiques de cette pathologie où aucun vaccin n'existe et où les chimiothérapies<sup>2</sup> présentent des inconvénients : toxicité, émergence de souches résistantes, prix prohibitif...[5, 6]

Le projet de recherche sur lequel cette thèse a été établie, repose sur le constat d'échec des traitements thérapeutiques des Trypanosomoses Africaines. A défaut de développer de nouvelles molécules médicamenteuses, nous nous sommes intéressés aux nouvelles formes galéniques dénommées les Systèmes de Délivrance de Médicament (S.D.M. ou D.D.S., *Drug Delivery System*). Ils correspondent aux technologies visant à améliorer l'efficacité de molécules médicamenteuses par action sur ses propriétés : Absorption/ Distribution/ Métabolisme/ Elimination.

---

<sup>2</sup> Traitements à bases de molécules médicamenteuses issus de la recherche et de la production chimique



Nous avons été attirés par l'usage de nanoparticules qui se définissent comme étant des solides dont une des dimensions au moins, est inférieure à 100 nanomètres (norme ISO/TS 27687: 2008). Dans le domaine de la santé et du biomédicale<sup>3</sup>, ces nanomatériaux servent d'agent de vectorisation de médicaments, d'implants biocompatibles ou encore de moyens de diagnostic miniaturisés. Ils sont classés en génération, selon leur degré de complexité: nanostructure passive, nanostructure active, nanosystème guidé et nanosystème évolutif.

Le développement de nanoparticules détenant des principes actifs dont elles confortent l'action thérapeutique, tout en éliminant leurs effets indésirables et iatrogènes, est une approche issue du concept « Magic Bullet » pensé par Paul Ehrlich (prix Nobel de médecine 1908, père fondateur de la chimiothérapie). Les effets recherchés sont une libération prolongée du médicament et une délivrance ciblée par un franchissement facilité des barrières biologiques en absence de toxicité rédhibitoire. La faisabilité de la délivrance intracellulaire de molécules médicamenteuse à l'aide de vecteurs thérapeutiques, a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques (Couvreur P. et *al.*, [7]; Kreuter J. et *al.*, [8, 9], Chavany C. et *al.*, [10]). Le fait que la distribution d'un principe actif devient indépendante de ses propriétés physico-chimiques pour devenir dépendante de la distribution du vecteur, rend cette approche prometteuse.

Toutefois, la conception de ces vecteurs et leur chargement en molécules actives restent compliqués. Ce travail de « *designer* » à l'échelle moléculaire doit prendre en considération de nombreuses exigences techniques (biodégradabilité, biocompatibilité), réglementaires (respect de l'environnement) et économiques (efficacité du traitement).

---

<sup>3</sup> Domaine visant au contrôle des systèmes biologiques ou au développement d'appareils servant au diagnostic et au traitement des patients

## Chapitre A.

### LA TRYPANOSOMOSE AFRICAINE

#### I. Généralités

La Trypanosomose Africaine (TA) est une maladie tropicale négligée dont les agents pathogènes sont des parasites unicellulaires. Ils ont la capacité d'infester de nombreux organismes (Reptiles, Amphibiens, Oiseaux et Mammifères, dont l'Homme) [6]. La répartition géographique de cette affection (Fig. 1) correspond à la distribution du vecteur : la glossine ou mouche tsé-tsé. Cet insecte vit exclusivement en Afrique subsaharienne (entre les parallèles 14°N et 20°S), à proximité de cours d'eau.



■ Foyers de cas de trypanosomiase africaine humaine (TAH)

■ TAH à *T. gambiense* (glossina palpalis)

■ TAH à *T. rhodesiense* (glossina morsitans)

➤ **Pays d'endémie à *T.b. gambiense* :**

- plus de 1 500 nouveaux cas/an : Angola, République du Congo, Soudan

- de 50 à 1 500 nouveaux cas/an : République centrafricaine, Tchad, Congo, Côte d'Ivoire, Guinée, Ouganda

- moins de 50 cas/an : Burkina-Faso, Cameroun, Guinée Equatoriale, Gabon, Nigeria, Bénin, Ghana, Mali, Togo

- aucun cas notifié mais aucune surveillance mise en place : Gambie, Guinée-Bissau, Libéria, Niger, Sénégal, Sierra Leone.

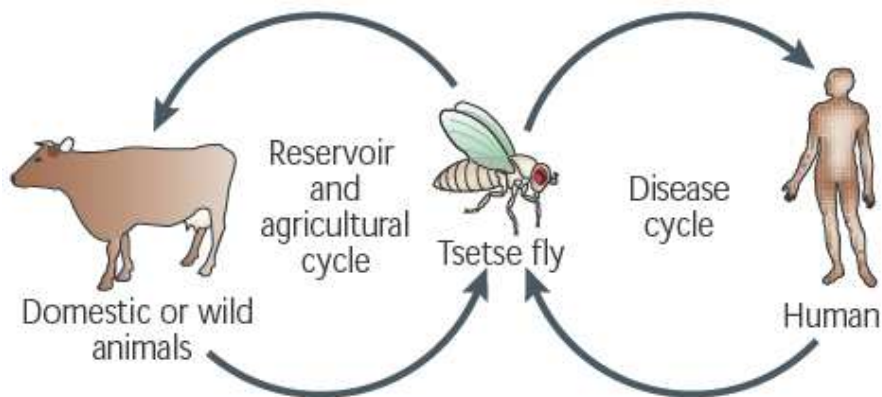
➤ **Pays d'endémie à *T. b. rhodesiense***

- de 50 à 1 500 cas/an : Malawi, Ouganda, Tanzanie

**Fig. 1 : Distribution géographique de la Trypanosomose Africaine Humaine [6]**

En 2006, l'OMS a estimé que cette maladie affectait environ 70 000 personnes.

Plus de 60 millions d'individus sont jugés à risque dans 36 des 52 pays d'Afrique [6]. La prise en charge de la TA Animale (TAA) ainsi que celle la TA Humaine (TAH) (Fig. 2) est un terrible défi socio-économique dans les pays endémiques, constituant un problème de santé public. En effet, l'étendue de la maladie chez les animaux domestiques (bovins, caprins, ovins, camélidés, canins, Oiseaux) est considérable. Cette infection est responsable, notamment, d'une forte chute de production de lait et de viande. Les TA aggravent ainsi la pauvreté et l'insécurité alimentaire des zones humides d'Afrique. Le FAO qui a monté un Programme de Lutte contre la TA (PLTA) [11], estime entre 600 millions à 1,5 milliards de Dollars américains le coût des programmes de son éradication. Toutefois, il faut garder à l'esprit, les raisons multiples du retour à la prévalence<sup>4</sup> de la TA à son niveau des années 1920 qui se résume d'une part, par la difficulté d'effectuer de la prévention dans les pays endémiques où souvent la situation politique est instable et d'autre part, par un relâchement des avancées scientifiques dans le domaine de la lutte contre ce fléau qui compte encore aujourd'hui que des traitements thérapeutiques à toxicité non négligeable [6, 12-18].



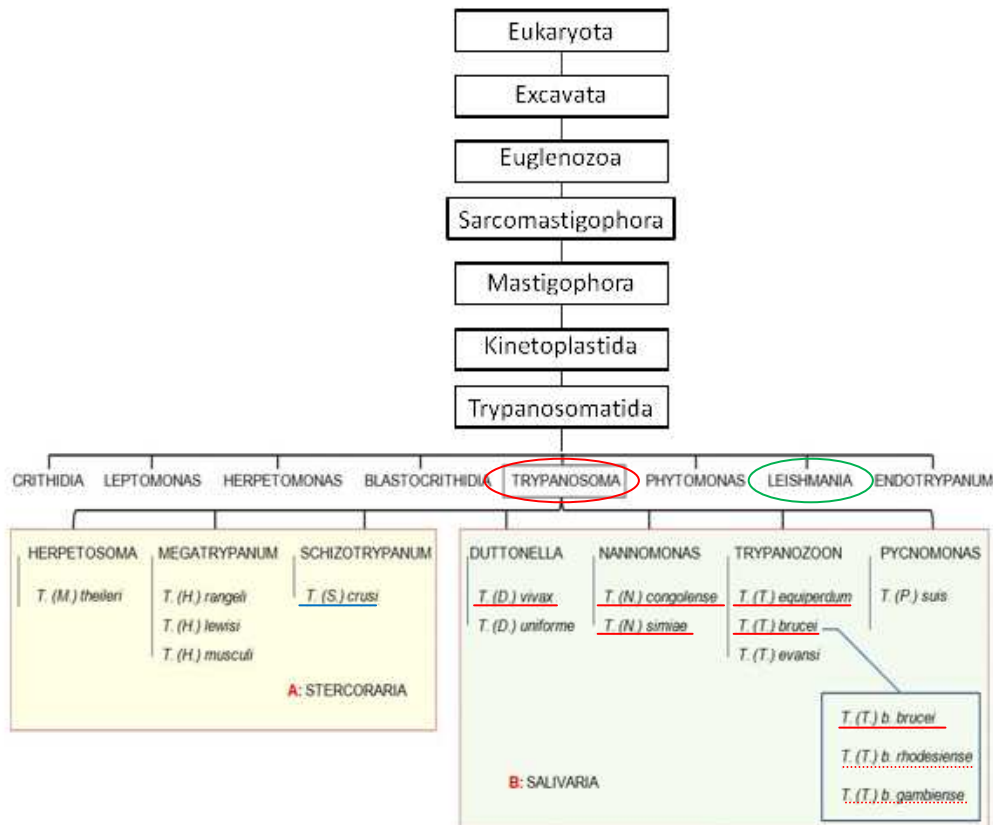
**Fig. 2 : Difficulté de la prise en charge de la Trypanosomose Africaine Humaine [19]**

Les Trypanosomoses humaines sont des anthroponozoonoses. Les animaux sauvages et les animaux domestiques dont ceux des milieux agricoles, représentent des réservoirs de parasites.

<sup>4</sup> Fréquence de cas existant, se distinguant du terme incidence qui se rapporte au nombre de nouveaux cas

## II. Taxonomie des trypanosomes

Les trypanosomes sont classés selon des critères morphologiques, physiologiques, paléontologiques, biochimiques et moléculaires. Ils sont dans le phylum Sarcomastigophora, l'ordre Kinetoplastida et la famille Trypanosomatidae [5].



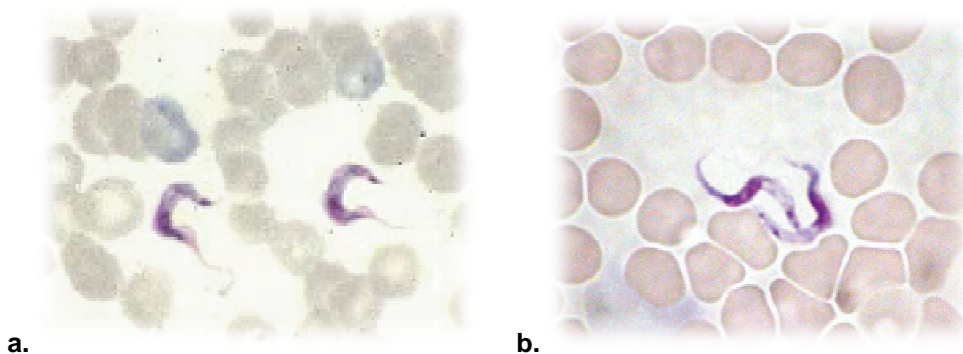
**Fig. 3: Classification des trypanosomes [5]**

- : Genre des agents des Leishmanioses
- : Genre des agents des Trypanosomoses
- : Agent de la Trypanosomose Américaine
- : Agents des Trypanosomoses Africaines Animales
- ... : Agents des Trypanosomoses Africaines Humaines

## II.1. La famille Trypanosomastidae

Trypanosomastidae regroupe des microorganismes protozoaires qui se caractérisent par l'acquisition d'un flagelle durant leur cycle de vie, leur reproduction asexuée par fission binaire<sup>5</sup> (ou scissiparité) et leur transmission vectorielle. Cette famille comprend 8 genres dont *Leishmania* et *Trypanosoma*, des espèces pathogènes pour l'Homme et les animaux :

- Le genre ***Leishmania*** (*L.*) comprend les agents pathogènes des quatre formes de Leishmanioses : Viscérale (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*), Cutanée (*L. tropica*, *L. mexicana*, *L. major*), Muco-cutanée (*L. braziliensis*) et Disséminée ; dont le vecteur est le phlébotome.
- Le genre ***Trypanosoma*** (*T.*) qui correspond aux trypanosomes, se distingue selon leur mode de transmission qui fait partie intégrante de leur classification. Deux sections sont alors distinguées :
  - o La section ***Stercoraria*** comprend les parasites affectant leur hôte suite à une contamination par les fèces de l'insecte, dont *T. cruzi* (Fig. 3) qui est l'agent de la Trypanosomose Américaine ou maladie de Chagas, dont le vecteur est le triatome (Réduve).
  - o La section ***Salivaria*** est composée de parasites transmis par la salive d'insectes et comprend les agents des Trypanosomoses Africaines qui se distinguent en trois sous-genres (Fig. 3) que nous allons voir plus en détail.



**Fig. 4 : Observations au microscope de frottis sanguins de patients atteints de la maladie de Chagas (*T. cruzi*) en a. et de la Trypanosomose Africaine (*T. brucei*) en b. [6]**

Les parasites sont marqués au Wright-Giemsa. Ces agents pathogènes unicellulaires se caractérisent par leur forme fusiforme et leur flagelle. Leur localisation est exclusivement extracellulaire pour *T. brucei* qui se distingue de *T. cruzi* qui nécessite un développement intracellulaire.

---

<sup>5</sup> La division du noyau est immédiatement suivie par la division cellulaire

### **II.1.1. Le sous-genre *Duttonella***

- *T. vivax* (du latin *vivus* « vif ») est appelé ainsi car, lorsqu'on l'observe au microscope, dans du sang contaminé, il bouge rapidement. Il présente une forme sanguine monomorphe, avec un flagelle libre. Sa longueur comprenant celle du flagelle, est de 18 à 31  $\mu\text{m}$ . Son kinétoplaste le distingue des autres trypanosomes pathogènes car il est le plus volumineux. Il est situé dans l'extrémité postérieure qui est enflée. Son noyau est central et sa membrane ondulante, discrète.

### **II.1.2. Le sous-genre *Nannomonas***

Il comprend les plus petits trypanosomes pathogènes, avec une longueur de 9 à 22  $\mu\text{m}$ .

- *T. congolense* (*T. cong.*) présente une forme sanguine monomorphe dépourvue de flagelle libre. Son noyau est central et son kinétoplaste de taille moyenne, se situe au niveau de l'extrémité subterminale ou marginale du corps. Son extrémité postérieure est arrondie et sa membrane ondulante est peu développée. Des études récentes subdivisent *T. cong.* par des marqueurs génétiques, principalement les isoenzymes : *T. cong. savannah*, *T. cong. tsavo*, *T. cong. forest*, *T. cong. Kilifi* [20, 21].
- *T. simiae*

### **II.1.3. Le sous-genre *Trypanozoon***

Il s'agit du sous-genre le plus homogène, représentant des espèces morphologiquement indistinguables.

- *T. equiperdum* est indistinguishable de *T. evansi*. Il ne présente pas de vecteur invertébré et est transmis sexuellement chez les chevaux.
- *T. brucei* (*T.b.*) présente un polymorphisme dans le sang de l'hôte qui se caractérise par la forme de la cellule, la position subterminale du complexe corps basal-kinétoplaste par rapport au noyau et l'extension de l'appareil flagellaire.
  - Sa forme **trypomastigote sanguine (TSg) fusiforme** représente la forme pathogène du trypanosome qui constitue le plus souvent les modèles expérimentaux de la TAH utilisés lors de l'étude de l'efficacité de traitements trypanocides. Elle est dotée d'un flagelle libre (Fig. 4) qui représente plus de la moitié de la longueur totale du parasite (25 à 35  $\mu\text{m}$ ). Son extrémité postérieure est pointue. Son noyau est central et sa membrane ondulante est développée.
  - Sa forme **TSg intermédiaire** présente un flagelle libre de longueur variable.

- Sa **forme TSg trapue** dépourvue de flagelle libre, présente une taille de 14 à 22 µm.
- *T. evansi* présente un monomorphisme compris entre les formes TSg fusiforme et intermédiaire et pourvu d'un flagelle libre.

## **II.2. La Trypanosomose Africaine Animale**

Les principaux agents pathogènes induisant la TAA sont *T. vivax*, *T. cong.*, *T. simiae*, *T.b. brucei* (*T.b.b*) et *T. evansi*.

- *T. vivax* infecte les ruminants sauvages et domestiques. Il est considéré comme moins pathogène que *T. cong.*. Néanmoins, il représente la plus importante menace de TAA chez les bovins<sup>6</sup> de l'Ouest de l'Afrique [22].
- *T. cong.* est probablement le trypanosome ayant la plus grande incidence économique en Afrique, car il affecte de très nombreuses espèces animales. Essentiellement pathogène chez les ruminants, cette espèce parasite aussi les équidés, les suidés, les canidés et les félidés [23]. L'anémie sévère rencontrée chez les animaux malades caractérise cette parasitose.
- *T. simiae* parasite essentiellement les suidés. Sa virulence chez le porc représente, en effet, un critère de discrimination entre *T. cong.* et *T. simiae*. Cette espèce est très pathogène, également, chez les Oiseaux et les camélidés et très rarement rencontrée chez les bovidés, les équidés et les félidés [23].
- *T.b.b.* est répandu en Afrique de l'Est et de l'Ouest. Il peut induire une forme chronique ou une forme sévère de la maladie causant une forte mortalité chez les bovins, les ovins et les caprins [23, 24].
- *T. evansi* se distingue par le fait qu'il sévit non seulement en Afrique (*surra*) mais également en Amérique latine et au Moyen-Orient. Il n'est pas transmis par la mouche tsé-tsé, mais par des mouches hématophages du genre *Tabanidae*. Il infecte le plus souvent les bovins, les camélidés et les équidés.

## **II.3. La Trypanosomose Africaine Humaine**

Les trypanosomes responsables de la TAH font partie de l'espèce *T.b.*. La première identification de cet agent pathogène date de 1901 par Dutton et Forde, suite à une observation

---

<sup>6</sup> La forme bovine de la TAA est également appelée *nagana*

au microscope (x 400) du sang d'un marin sujet à de nombreux accès fébriles. Ils le désignent sous le nom de *Trypanosoma gambiense*, décrivant ainsi, la fièvre à trypanosome de Gambie.

Cette sous-espèce *T.b. gambiense* (*T.b. gamb.*) sévit en Afrique Occidentale et Centrale (Fig. 1). Elle est responsable de la forme chronique de TAH qui représente 90% des cas reportés. La forme aiguë de TAH est induite quant à elle par *T.b. rhodesiense* (*T.b. rhod.*) et sévit en Afrique Orientale (Régions des grands lacs). Dans chaque pays, la distribution spatiale de la maladie est très hétérogène et se répartit par foyers et micro-foyers (Fig. 1).

A la différence de *T.b. gamb.*, *T.b. rhod.* est responsable de zoonose. Il peut être infectieux chez l'espèce bovine, chez laquelle il provoque un syndrome de gravité allant de l'infection inapparente à une méningo-encéphalite comparable à celle observée dans la maladie du sommeil [25]. Ce parasite peut infecter les animaux domestiques et sauvages, sans nécessairement induire de pathologie, constituant un réservoir du pathogène, dont le rôle épidémiologique exact demeure assez mal connu (Fig. 2).

Ces sous-espèces de *T.b.* ne peuvent être différenciées morphologiquement l'une de l'autre par la microscopie classique [26]. Elles ne peuvent être également distinguées de *T.b.b.* qui peut infecter de nombreux mammifères, mais pas l'Homme. En effet, il est sensible à l'activité cytotoxique innée du sérum humain normal contenant le facteur de lyse des trypanosomes (TLF) [27-29].

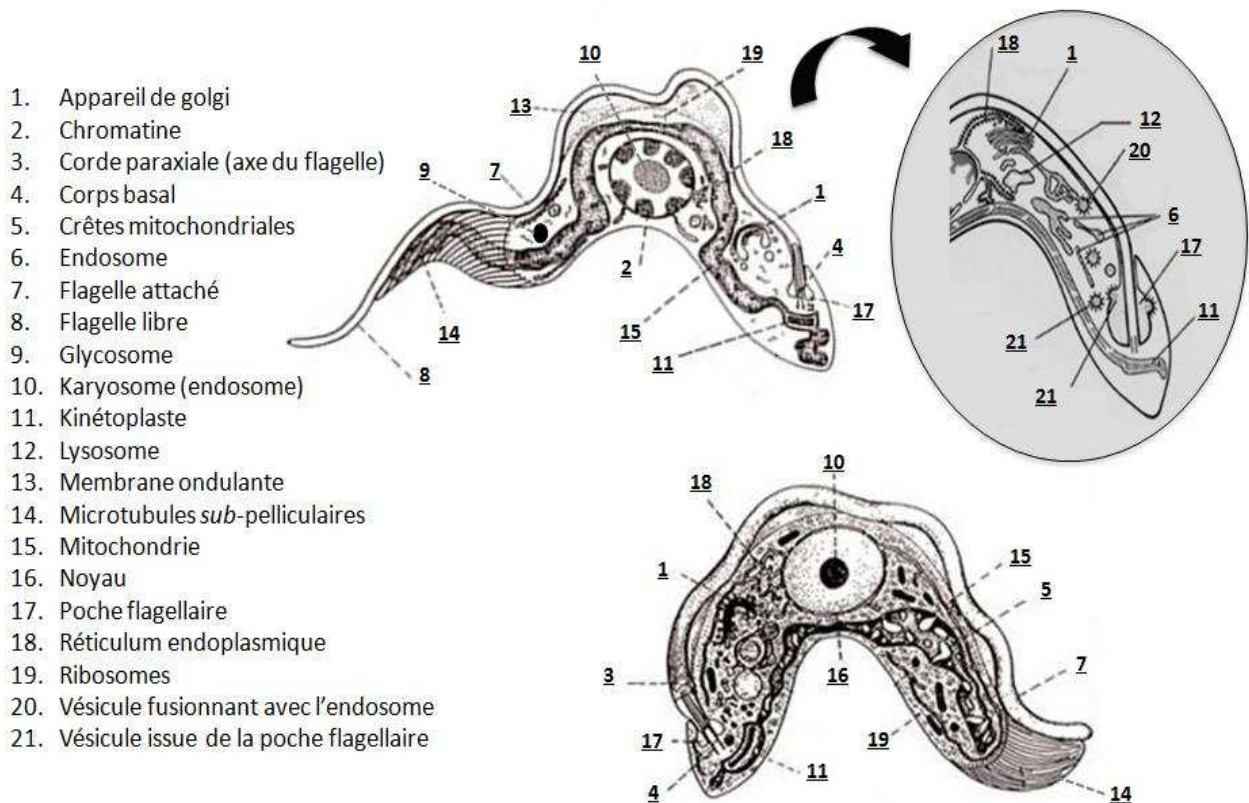
Des techniques de PCR permettent toutefois, de différencier ces sous-espèces. Des études de leur génome mettent en évidence que *T.b. rhod.* est plus proche de *T.b.b.* que de *T.b. gamb.* qui contient moins d'information génétique.

#### **II.4. Physiologie des trypanosomes sous une forme trypomastigote sanguine**

Au cours de l'infection dans un organisme de mammifère, le trypanosome présente ou non un polymorphisme qui se caractérise par de nombreuses particularités structurales (Fig. 2) et métaboliques [6, 30]. Cette architecture cellulaire reste fortement conservée chez les Trypanomastidae comme *Leishmania spp* et *T. cruzi*.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la forme TSg fusiforme de *T.b.* qui est le modèle expérimental sur lequel nous avons testé notre formulation colloïdale de diminazène.





**Fig. 5 : Schéma de l'ultrastructure de trypanosomes du groupe *Trypanosoma brucei* (en haut) et *Trypanosoma congolense* (en bas) au stade trypomastigote sanguin (observations en microscopie électronique) [26, 31].**

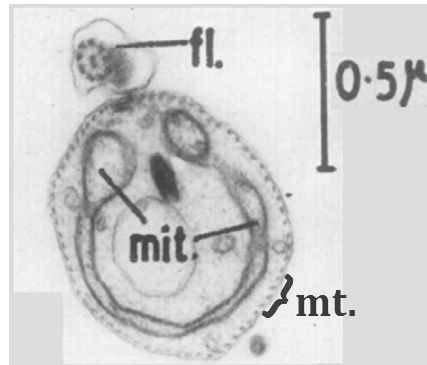
#### **II.4.1. La paroi du corps cellulaire**

Le corps cellulaire est délimité par une paroi, le périplasma constitué de trois couches. La médiane, est la moins dense et correspond à une bicouche lipidique. L'interne, est un tapis de microtubules *sub*-pelliculaires (Fig. 2) et l'externe, un ensemble de glycoprotéines variantes de surface constituant un manteau.

##### **II.4.1.1. Le réseau sous-pelliculaire**

Les microtubules sous-pelliculaires, au même titre que l'axonème flagellaire et le corps basal, constituent le cytosquelette du trypanosome.

Ils sont composés de protéines tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  polymérisées en organelles cylindriques de 25 nm de diamètre observable en microscopie électronique (Fig. 6). Dans les trypanosomes, les microtubules sous-pelliculaires présentent des liens entre eux et la membrane plasmique [32] et des interconnexions particulièrement fortes [33].



**Fig. 6 : Section transversale de l'extrémité antérieure d'un *Trypanosoma brucei* au stade trypomastigote sanguin**

mit. : courbe arrondie de mitochondrie réduite, fl. : flagelle, mt. : microtubules *sub*-pelliculaires couvrant la face interne du corps cellulaire.

#### **II.4.1.2. Le manteau de glycoprotéines**

Cette armure de 15 nm d'épaisseur recouvre la totalité du trypanosome (tableau 1) [31]. Elle résulte de l'assemblage de dimères de glycoprotéines appelées Antigènes Variables de Surface ( $\sim 5 \times 10^6$  AVS dimériques par cellule), ancrés dans la membrane plasmique par des groupements glycosylphosphatidyl inositol (GPI) [34]. Le manteau d'AVS est une caractéristique des formes infectieuses qui se distingue de la forme de transmission (forme TSg trapue) où le trypanosome se recouvre de monomères de procycline à ancre GPI.

Les AVS sont impliqués dans la stratégie qu'emploie les trypanosomes africains pour échapper aux défenses immunitaires de l'hôte mammifère [35-37]. En effet, ces parasites restant extracellulaires, sont fortement exposés au système immunitaire de l'hôte. Ce manteau protéique dense et fortement immunogène, les protège donc contre la lyse induite par les protéines du complément. Ce système de protection se distingue d'ailleurs de celui employé par les agents pathogènes de la maladie de Chagas et des Leishmanioses qui, afin d'être furtifs dans l'organisme de l'hôte, emploient la stratégie du cheval de Troie en adoptant des formes intracellulaires.

Il n'est pas à exclure que le manteau protéique des TSg jouerait un rôle dans le franchissement des barrières biologiques.

Molécule ou activité	Trypomastigote sanguin	Trypomastigote procyclique	Epimastigote	
<b>Expression des protéines de surface</b>				
<b>AVS</b>	50 000 000*	indéetectable	ND	
<b>Procycline</b>	indéetectable		ND	
<b>BARP</b>	indéetectable	indéetectable	Exprimée	[38]
<b>ISG65</b>	70 000*	indéetectable	ND	[39, 40]
<b>ISG75</b>	50 000*	indéetectable	ND	[39, 40]
<b>SRA</b> ♂	Exprimée	indéetectable	ND	[41, 42]
<b>RrTf</b> ♂	2 300*	indéetectable	ND	[43-45]
<b>RrLDL</b> ♂	Exprimée	Exprimée	ND	[46]
<b>HPHBR</b> ♂	Exprimée	ND	ND	[47]
<b>CRAM</b> ♂	Exprimée	Exprimée	ND	[48]
<b>Expression des protéines du trafic intracellulaire</b>				
<b>Clathrine</b>	Forte	Faible	Faible	[49]
<b>RAB5A &amp; RAB5B</b>	Faible	Faible	Faible	[46]
<b>RAB11</b>	Forte	Faible	Faible	[50]
<b>EpsinR</b>	10 000*	10 000*	ND	[51]
<b>Activité</b>				
<b>Exocytose</b>	Modérée	Modérée	Modérée	[52]
<b>Recyclage</b>	Forte	Modérée	Fortement	[52]
<b>Endocytose</b>	Très forte	Modérée	Fortement	[52]

**Tableau 1: Expression des protéines ayant un rôle dans le transport intracellulaire ou constituant le manteau des trypanosomes aux stades trypomastigote sanguin, trypomastigote procyclique et épimastigote [19]**

\* nombre de copie estimé, ♂ protéines détectées exclusivement au niveau de la poche flagellaire, || protéines présentant une ancre GPI.

**ISG** : Invariant Surface Glycoprotein, **ND** : Non Déterminée, **SRA** : Serum Resistance-Associated protein, **AVS** : Antigène Variable de Surface, **R'Tf** : Récepteur à la Transferrine, **CRAM**: Cystein-Rich Acidic integral Membrane protein, **R'LDL**: Récepteur de la Low Density Lipoprotein, **HPHBR**: Haptoglobin-Haemoglobin Receptor.

### ***II.4.1.3. Les protéines trans-membranaires***

Par définition, les parasites ont besoin pour survivre de nutriments issus de l'hôte. Cette activité s'effectue soit par osmose (oxygène, glucose, acides aminés, ...), soit par un transport actif. Ce dernier nécessite la présence de transporteurs transmembranaires au niveau de la membrane plasmique (ex : les transporteurs d'adénosine, P<sub>1</sub> pour la reconnaissance de l'inosine et P<sub>2</sub>, pour l'adenine, palliant l'absence de synthèse *de novo* de purine [53], des récepteurs d'endocytose de facteurs de croissance ou de la transferrine (Tf)) (tableau 1).

#### **II.4.2. Le flagelle**

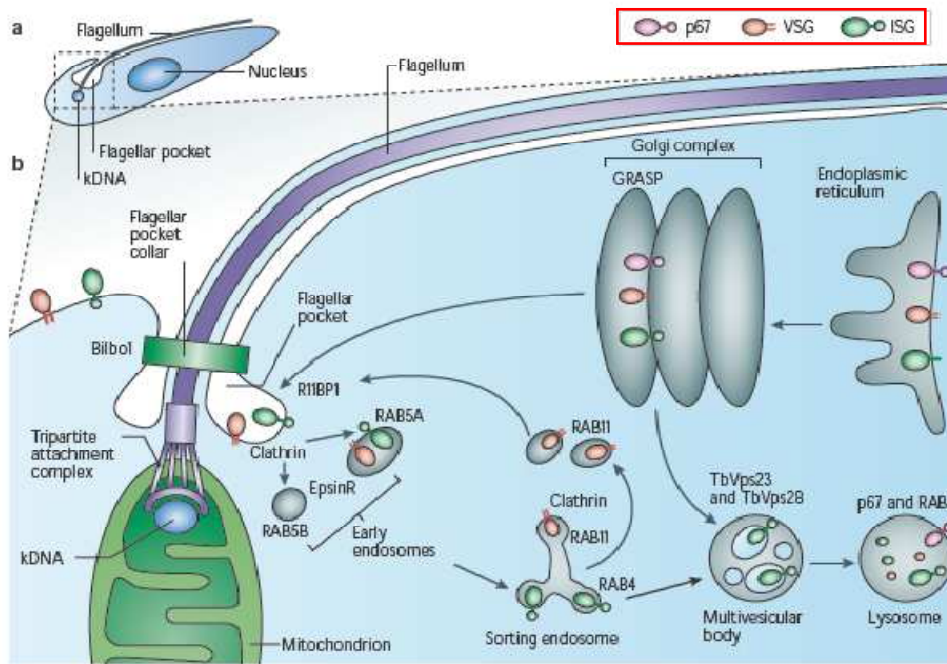
Le flagelle émerge de la poche flagellaire (petite invagination de la membrane plasmique, Fig. 5) puis s'étend le long du corps cellulaire en formant la membrane ondulante (système complexe de fins filaments). Le flagelle se compose d'un axonème de structure microtubulaire classique 9+2 (Fig. 6) [54]. Il est initié à son point de fixation dans le cytoplasme, à partir d'un corps basal de structure centriolaire classique à 9 triplets, associé perpendiculairement à un centriole secondaire sans flagelle.

#### **II.4.3. La poche flagellaire**

La poche flagellaire (PF) intervient d'une part dans la polarité cellulaire et la division cellulaire, et d'autre part, constitue le siège exclusif de l'activité d'endocytose/ exocytose (Fig. 7) [19, 55]. D'ailleurs, il faut préciser que *T. cong.* est dépourvu de flagelle, pas de la PF (Fig. 5).

Le système endomenbranaire est fortement polarisé. En dehors du réticulum endoplasmique (RE) qui est réparti à travers le cytoplasme, les organelles de sécrétion et d'endocytose sont situées entre la PF, le kinétoplaste et le noyau où se trouve à proximité l'unique lysosome (Fig. 7). L'appareil de golgi (AppG) présente une structure multivésiculaire à face *cis*- et *trans*- et différencie les endosomes de triage et de recyclage.

Le protéome de la membrane correspondant à la PF (2,4% de la surface totale) se distingue du reste de la surface du parasite (tableau 1) [19]. Des changements de composition sont liés au stade évolutif du parasite. Cette restriction est associée aux interactions possibles avec son hôte. Le R<sup>Tf</sup>, le SRA (serum resistance-associated protein) et le récepteur haptoglobuline (HP) - hémoglobuline (HB) ou HPHBR sont exprimés dans la PF de la forme TSg afin de lier des composantes du serum du mammifère [42, 44, 47].



**Fig. 7 : Architecture de la poche flagellaire (PF) [19]**

En a. Positionnement de la PF par rapport à l'ensemble du corps du trypanosome.

En b. Organisation des organites nécessaires à la division cellulaire (réplication fidèle et cytotière), à l'endocytose et au trafic intracellulaire (recyclage). Cette structure inclut le flagelle, la PF, le kinétoplaste (**kDNA**), la mitochondrie, le complexe golgien, le noyau et très probablement le lysosome. Les marqueurs moléculaires permettant de définir chaque compartiment sont annotés : Rab, **R11BP1** (protéine en hélice interagissant avec **RAB11**), **Vps23** et **Vps28** (orthologues au ESCRT, Endosome Sorting Complex Required for Transport). Le trafic intracellulaire de trois protéines, est schématisé : l'antigène variable de surface (**VSG**) qui est recyclé. La glycoprotéine de surface invariable 65 (**ISG**) qui est endocytée suite à un mécanisme ubiquitine-dépendant et **p67** qui est trié suite à un mécanisme dileucine-dépendant. Les flèches représentent les mouvements probables de matériels entre les compartiments.

**GRAST**: Golgi ReAssembly-Stacking Protein.

### **II.4.3.1. L'endocytose**

Les familles de protéines nécessaires au transport spécifique des vésicules sont présentes chez les trypanosomes. Les protéines Rab interviennent dans les phénomènes d'exocytose, d'endocytose, de recyclage et des transports rétrogrades (Fig. 7).

Toutefois, à la différence des Eucaryotes supérieurs, les Tsg présentent un mécanisme d'endocytose particulier. Il est exclusivement clathrine-dépendant, ne nécessite pas l'intervention de la dynamine<sup>7</sup> et d'autres protéines interagissant généralement avec les filaments d'actine [56-58]. Le seul facteur qui pourrait être issu d'un phénomène d'adaptation est le membre de la famille à domaine ENTH, l'EpsinR qui lors de l'abolition de son expression,

<sup>7</sup> La dynamine-GTP est une protéine cytoplasmique recrutée lors de la formation de vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine. L'hydrolyse du GTP conduit au décollement de la vésicule de la membrane plasmique qui est alors relargée dans le cytoplasme.

induit une internalisation défectueuse des protéines ancrées dans la membrane cellulaire par un groupement GPI ou par un autre type de domaine transmembranaire [51].

Le mécanisme d'endocytose des trypanosomes est probablement adapté pour effectuer de l'endocytose rapidement et d'une manière non-spécifique [19].

#### **II.4.3.2. Le triage intracellulaire**

Le triage des molécules internalisées et des composants endomembranaires se produit au niveau des endosomes tardifs [49]. Les AVS sont rapidement retournés à la surface à l'aide de vésicules portant le RAB11. Les AVS et les R<sup>Tf</sup> qui sont tous deux ancrés dans la membrane plasmique par un GPI, sont activement recyclés. Ce phénomène suggère que les ancrages lipidiques induits par défaut un recyclage fréquent [19]. La CRAM (cysteine-rich acidic integral membrane protein), une protéine transmembranaire située au niveau de la PF présente de multiples signaux de triage qui participent à la fois à l'exportation antérograde des RE et à l'endocytose [48].

#### **II.4.4. Le cytosol**

Le cytosol est un élément amorphe, mais très concentré (20% de protéines et 70% d'eau) dans lequel baignent des inclusions cytoplasmiques diverses. Il occupe tout l'espace entre la membrane externe et le noyau. Il contient en particulier, des systèmes enzymatiques importants pour la vie de la cellule et des ribosomes chargés de la synthèse protéique à partir d'un ARN messager (ARNm) issu du noyau.

#### **II.4.5. Les corpuscules intra-cytoplasmiques**

Le cytoplasme contient des organites (RE, lysosomes, endosomes...) et des inclusions variées. Le parasite présente des compartiments qui le distinguent des autres eucaryotes, le glycosome et le kinétoplaste.

##### **II.4.5.1. Le glycosome**

Chez le *T.b.* TSg fusiforme, le glycosome représente l'unique source d'énergie par glycolyse [59]. En effet, d'après Vickerman K. et *al.*, la forme infectieuse de *T.b.* ne présente pas de respiration mitochondriale d'où l'absence des enzymes du cycle de Krebs et du système de transport d'électron (système cytochrome) [26, 60]. Il retrouve toutefois, cette activité quand il adopte une forme TSg trapue. En absence d'oxygène, il y a production de glycérol dans le glycosome, pour équilibrer la balance NADP<sup>+</sup>/ NADPH. Les enzymes intervenant dans le

métabolisme du glucose présentent une structure qui se distingue des enzymes des mammifères, représentant ainsi de bonnes cibles thérapeutiques [61, 62].

#### **II.4.5.2. Le compartiment mitochondrial**

A l'intérieur d'une grande et unique mitochondrie qui s'étend sur toute la longueur du parasite, se trouve le kinétoplaste (Fig. 2). Il correspond à une structure composée essentiellement d'ADN condensé sous la forme d'un corpuscule de 10 à 15  $\mu\text{m}$  qui communique avec le corps basal [63]. Il est le support génétique régulant les adaptations métaboliques aux différents milieux où évolue le trypanosome.

L'ADN est circulaire et représente 10 à 20% de l'ADN cellulaire [64]. Cet ADN kinétoplastique (ADN $k$ ) est organisé en un réseau complexe de maxicercles et de minicercles. Les maxicercles contiennent de nombreux gènes codant pour des composés et des enzymes participant au système de transport d'électrons qui génère de l'énergie. Ils comprennent deux régions distinctes: des régions de gènes codants, très bien conservées entre les différentes sous-espèces et des régions variables.

La plasticité inter- et intra- espèce de cet ADN $k$  correspond à la variation en terme de taille et d'organisation des minicercles et des régions variables des maxicercles [65, 66].

#### **II.4.6. Le noyau**

Le noyau est entouré d'une double membrane perforée. Il renferme le karyosome ou nucléole et des granules de chromatine doublant la face interne de la membrane nucléaire. La position du noyau est variable en fonction du stade évolutif du parasite. Sous ses formes TSg, il est situé au centre ou dans la moitié antérieure. Le noyau contient le génome haploïde<sup>8</sup> qui a été entièrement séquencé chez *T.b.* et compte environ 35 mégabases subdivisées en 11 chromosomes de 0,7 à 6 Mpb, des chromosomes intermédiaires et 0 à 100 mini-chromosomes de 25 à 150 kpb codant pour plus de 10 000 gènes polycistroniques<sup>9</sup>. Le génome nucléaire des trypanosomes n'est pas facile à étudier. En effet, il présente une plasticité inter- et intra-espèce en terme de nombre et de taille des chromosomes [65, 66]. Par exemple, *T. cong.*, *T.b.b.*, *T.b. rhod.* possèdent 100 à 120 minichromosomes, *T.b. gamb.* : 10, *T. vivax* et *T. cruzi* n'en possèdent pas [21, 67]. De plus, un même gène peut être présent en plusieurs exemplaires avec des tailles et des emplacements variables [68].

---

<sup>8</sup> Présentant une seule série de chromosome : n chromosome, se distinguant des organismes diploïdes (2n)

<sup>9</sup> Gène codant pour un ARN messager contenant plusieurs cistrons, et donc codant pour plusieurs protéines

Il est également important de souligner que *T.b.* est devenu un modèle expérimental de choix, grâce au développement de l'ARN interférence (ARNi) comme outil de régulation de l'expression des gènes [69].

#### **II.4.7. Les voies métaboliques particulières**

##### **II.4.7.1. Le système antioxydant**

Les trypanosomes évoluent dans un milieu aérobie, ils sont donc exposés à des espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) comme l'ion superoxyde :  $O_2^-$ , le peroxyde d'hydrogène :  $H_2O_2$ , le radical<sup>10</sup> hydroxyl :  $HO\cdot$ . Pour se protéger, les trypanosomes possèdent une classe d'enzymes antioxydantes, les protéines thiols spécifiques anti-oxydantes (TSA) encore appelées les peroxiredoxines [70, 71]. Le métabolisme thiol (-SH) est assuré par le trypanothione (N1, N8-bis-glutathionylspermidine), une molécule thiol unique qui correspond à deux molécules glutathion liées par une spermidine. Une des enzymes essentielles à ce métabolisme est le trypanothione réductase, qui constitue une bonne cible thérapeutique [72].

##### **II.4.7.2. La synthèse des polyamines**

Les polyamines sont des molécules à structure simple, présentes chez toutes les espèces du monde animal. Elles jouent en particulier, un rôle dans la prolifération cellulaire. Leur concentration intracellulaire est finement régulée par un système de transporteurs membranaires qui sont spécifiques, saturables, et thermosensibles. Leur expression s'adapte à la concentration cellulaire des polyamines.

L'ornithine est le précurseur exclusif des polyamines. Elle est transformée, notamment lors de la prolifération cellulaire, en putrescine, sous l'action d'ornithine décarboxylase (ODC). La putrescine devient spermidine, puis spermine sous l'action de synthétases en utilisant la S-adénosyl méthio-décarboxylase.

##### **II.4.7.3. Le métabolisme des lipides**

L'adaptation du trypanosome à son milieu environnemental induit une nouvelle distribution de ses composants lipidiques. En effet, il a été montré qu'elle varie entre l'étape trypomastigote procyclique et TSg (Fig. 8). Cette homéostasie lipidique met en jeu une variété de facteurs régulant l'activité des enzymes responsables de leur synthèse *de novo*. Cette

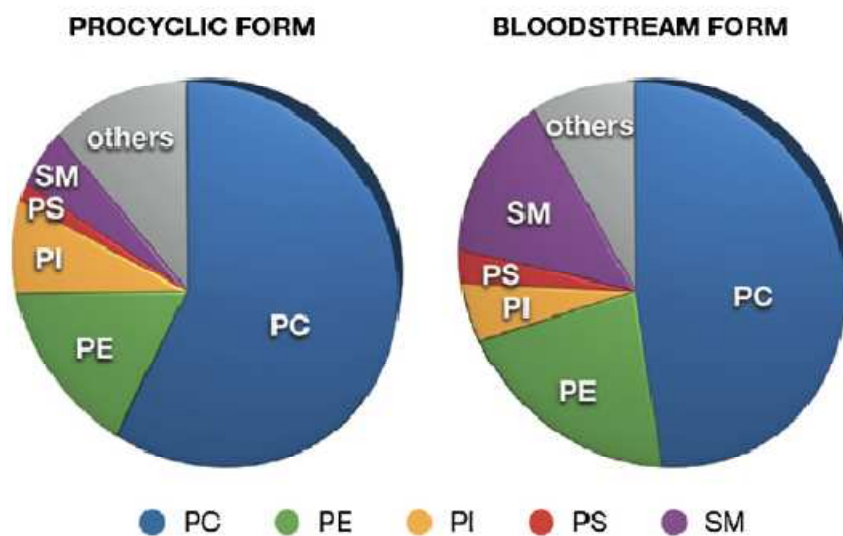
---

<sup>10</sup> Les radicaux libres sont des molécules pourvues d'un atome possédant un électron en plus, un singulet



dernière s'effectue soit à partir de molécules précurseurs provenant de l'hôte [73], soit du catabolisme de lipides endocytosés [74].

Des études s'intéressent particulièrement aux synthèses des acides gras intervenant dans la composition des ancres GPI (protéine farnésyl transférase), des principaux glycérophospholipides, sphingolipides, et aux réactions cataboliques (phospholipases, sphingomyélinases).



**Fig. 8 : Composition lipidique de *T. brucei* sous ses formes trypanostigote procyclique et trypanostigote sanguine**

Phospholipide de la classe: phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS) et sphingomyéline (SM).

Les autres incluent IPC (phosphorylceramide inositol), EPC (phosphorylceramide ethanolamine), CL (cardiolipine), PG (phosphatidylglycérol), PIPs, acide phosphatidique, lyso-phospholipides, les prényls phosphorylés, Dol-Ps.

### III. Cycle de vie du trypanosome africain

#### III.1. Un parasite hétéroxène

Le trypanosome africain est dit un parasite hétéroxène car il nécessite un hôte intermédiaire, la mouche tsé-tsé, pour atteindre son stade infestant (Fig. 9). Cet hôte est également nommé vecteur, car il assure la dissémination du pathogène. Les hôtes définitifs sont des vertébrés, le plus souvent des Mammifères. Durant leur cycle de vie, les trypanosomes présentent au moins 10 formes évolutives et des étapes de proliférations au sein de l'organisme des deux types d'hôtes. Les étapes de transition (insecte à mammifère, et *vice versa*) sont accompagnées d'un arrêt de la division cellulaire et d'un remodelage cellulaire : structure, transport intracellulaire, métabolisme primaire et l'expression génique [75, 76].

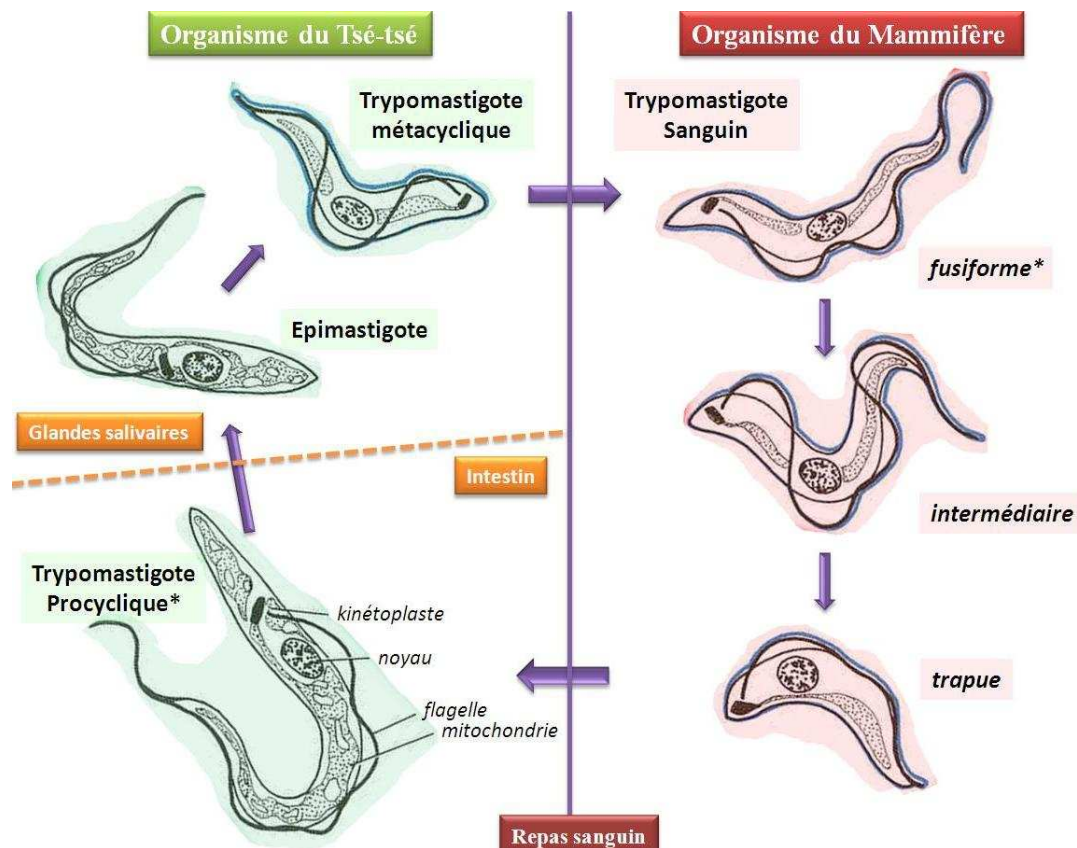


Fig. 9 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*

L'infection débute après l'inoculation du trypanosome à un mammifère par une mouche tsé-tsé hématophage. Le trypanosome se développe dans le sang sous une forme mince, allongée (25-30  $\mu\text{m}$ ) et munie d'un flagelle libre. Il s'agit de la forme trypomastigote sanguine (TSg) fusiforme. Il se multiplie par scissiparité dans le système hémolympatique puis envahit finalement le liquide céphalo-rachidien provoquant de graves troubles neuro-psychologiques. Le TSg trapue, dépourvue de flagelle, est la forme transmissible au vecteur. Il se développe dans son intestin moyen sous la forme trypomastigote procyclique. Il migre ensuite vers ses glandes salivaires où, d'une étape épimastigote, il se transforme à nouveau en trypomastigote métacyclique, correspondant à la forme inoculable aux mammifères. (*En bleu* : manteau de glycoprotéines de surface, \* multiplication par scissiparité)

### **III.2. L'hôte intermédiaire**

Tous les *T.b.* sont transmis par des mouches tsé-tsé des deux sexes et du genre *Glossina* (ordre: Diptera). Dans le continent Africain, 31 espèces et sous-espèces de glossine ont été identifiées. Les glossines sont très mobiles, mais ont besoin de conditions particulières de température, d'humidité et de végétation pour vivre. La transmission du parasite peut, toutefois avoir d'autres origines. En effet, elle peut être induite par piqûre accidentelle d'une aiguille contaminée ou encore, par transmission materno-foetale, le parasite franchissant la barrière placentaire.

Le parasite adopte différentes morphologies en fonction du stade évolutif qu'il atteint (Fig. 9). Une fois ingéré par la mouche, le cycle évolutif prend environ trois semaines. Le parasite se multiplie, passant alors par plusieurs stades dans l'intestin de l'insecte : Trypomastigote procyclique, puis dans les glandes salivaires : Epimastigote suivi par le stade Trypomastigote métacyclique (TMt), forme infestante pour le mammifère (Fig. 9).

### **III.3. L'hôte définitif, symptômes induits**

La physiopathologie de la TA est difficile à définir et peut être confuse. Elle varie en fonction des différentes espèces d'hôte et de parasites.

#### Dans le cas de la TAH :

La piqûre d'insecte inocule le trypanosome dit TMt dans les tissus sous-cutanés de l'hôte. Le TMt devient alors un TSg et se multiplie par scissiparité dans le tissu sanguin. Cette présence de TSg, dans un premier temps localisé, entraîne chez l'hôte, l'apparition d'un **chancre d'inoculation** (trypanome), rarement observé lors d'une infection au *T.b. gamb.* [6, 77]. Cette réaction inflammatoire muco-cutanée est induite suite à la reconnaissance du pathogène (complexes immuns<sup>11</sup>) activant les protéines du complément (C3a et C5a) qui activent à leur tour les cellules polynucléaires.

Lors de la **phase hémolympatique**, le TSg se propage dans les tissus sanguins et lymphatiques, restant extracellulaire. Des infiltrats péri-vasculaires se forment dans les organes lymphatiques, puis envahit progressivement la plupart des organes, favorisant la propagation du pathogène dans le foie, la rate, la moelle osseuse et le cœur. Une des hypothèses sur l'origine de ces infiltrats péri-vasculaires serait l'augmentation de la perméabilité capillaire provoquée par les complexes immuns circulants issus de la lyse successive de populations

---

<sup>11</sup> Association d'un antigène et d'un anticorps monoclonal issu de l'immunité humorale dont le principal acteur est le lymphocyte B.

parasitaires et l'accumulation de leurs molécules circulantes. Ces infiltrations induisent des poussées de fièvre, des céphalées, des douleurs articulaires, un prurit et une inflammation des ganglions cervicaux. Dans le cas d'une infection à *T.b. gamb.*, cette première phase peut être asymptomatique durant plusieurs mois, voire plusieurs années. Elle se caractérise principalement par une vaste perturbation du SNC, à la différence de l'infection à *T.b. rhod.* où la mort peut intervenir en quelques mois suite à des dommages viscéraux sans perturbation importante du SNC [6, 78, 79].

Dans l'organisme de l'hôte, la parasitémie est oscillante [80]. En effet, des vagues de parasitémie se succèdent correspondant à des phénomènes "d'échappement" aux défenses immunitaires de l'hôte. Elles sont corrélées au taux croissant d'immunoglobulines (Ig), particulièrement de type IgM, dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR).

Le comment et le pourquoi de l'invasion du SNC n'est pas très clair, cependant le portail d'entrée serait le plexus choroïdien [6, 81-83]. Cette **phase méningo-encéphalitique** ou **de polarisation cérébrale**, est progressive et induit des désordres neurologiques : confusion, ataxie<sup>12</sup>, somnolence, troubles du rythme circadien [84] et des dysfonctionnements endocriniens : trouble de la régulation thermique et de la soif, perte de la libido, aménorrhée, insuffisance thyroïdienne. Des changements histologiques sont rapportés : infiltration par des cellules mononuclées (lymphocytes et monocytes) et astrocytose comme la démyélinisation induite par des anticorps anti-myélines [79, 85].

Les principales lésions anatomopathologiques, non seulement du cerveau, mais également des autres organes, seraient d'origine immunitaire, ainsi le trypanosome ne jouerait qu'un rôle d'inducteur.

---

<sup>12</sup> Pathologie neuromusculaire qui consiste en un manque de coordination fine des mouvements volontaires liée à une atteinte du système nerveux

#### **IV. La pathogénicité des trypanosomes**

L'infection à *T.b.* induit des réactions inflammatoires et une dégénérescence du tissu conjonctif et du système réticulo-endothélial, alors qu'une infection à *T. cong.* ou *T. vivax* se déroule principalement, dans le système circulatoire et s'associe au développement d'une anémie et d'une anoxie<sup>13</sup> [86, 87]. La pathogénicité<sup>14</sup> de *T.b.*, diffère, ainsi considérablement de celle de *T. cong.* et de *T. vivax*.

La pathogénicité de *T.b. rhod.* chez l'Homme se distingue également de celle de *T.b.b.* par l'expression de la protéine SRA qui inhibe TLF [28]. *T.b. gamb.*, qui est moins virulent<sup>15</sup> que *T.b. rhod.* n'exprime pas SRA.

La stratégie invasive des trypanosomes est établie au niveau moléculaire. Elle est dépendante du génome qui s'exprime au travers de la transcription de l'ARN et permet la production de protéines fonctionnelles. Les protéines induisant la pathogénicité du parasite correspondent au système d'excrétion/ sécrétion, encore nommé secrétome par Holzmuller P. et al., [88]. Ces facteurs moléculaires sont exposés en surface du corps cellulaire et/ ou libérés dans le plasma de l'hôte. Ainsi, la pathogénicité des trypanosomes se distingue par la spécificité de chaque espèce et sous-espèce dans l'expression de protéines du secrétome [88-92].

#### **V. Les stratégies de défense des trypanosomes**

##### **V.1. La variation antigénique**

La variation antigénique est le procédé par lequel le parasite alterne naturellement l'expression de ses AVS encodés par des familles multigéniques. L'expression alternative d'AVS est utilisée pour éluder la réponse immunitaire de l'hôte.

L'injection d'une population parasitaire exprimant le même AVS 1 (clone 1) à un animal immunocompétent provoque un premier pic de parasitémie où tous les trypanosomes expriment l'AVS 1. Le système immunitaire de l'animal tue la plupart des parasites, mais il suffit qu'un seul exprime un autre AVS (AVS 2) de définition antigénique différente, pour que la parasitémie augmente à nouveau formant ainsi la seconde vague infestante (Fig. 10).

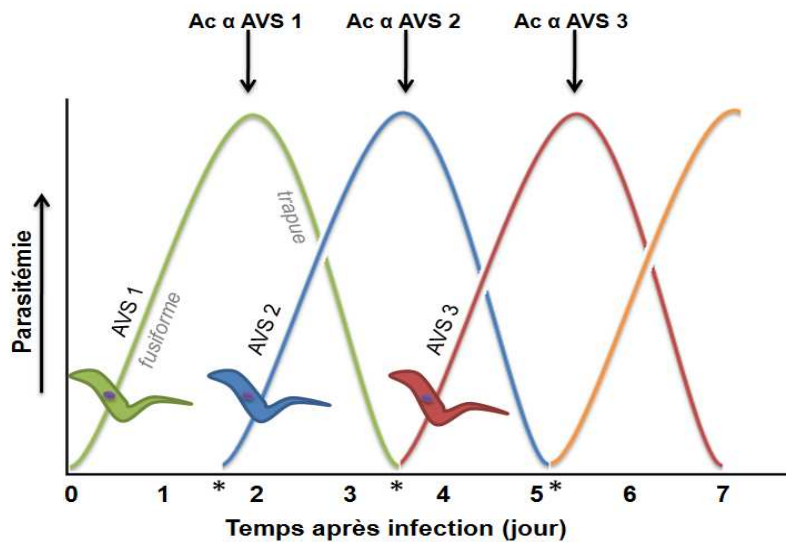
Ce stratagème est employé par divers pathogènes viraux notamment le VIH. Ainsi, les hommes et les animaux infectés par des trypanosomes pathogènes sont incapables de développer une réaction immunitaire efficace à long terme.

---

<sup>13</sup> Diminution de la quantité d'oxygène contenue dans le sang

<sup>14</sup> Capacité à induire une maladie

<sup>15</sup> Capacité à se multiplier dans le corps de l'hôte



**Fig.10 : Vagues successives de parasitémie lors d'une infection à *T. brucei***

La multiplication des antigènes variables de surface de type 1 (AVS 1) sur le corps du trypanosome fusiforme conduit à un premier pic de parasitémie. Des anticorps spécifiques anti- AVS1 (Ac α AVS 1) sont rapidement produits éliminant les parasites de types AVS 1 sous forme fusiforme, les formes trapue étant plus résistantes aux Ac. L'émergence d'hétérotypes AVSx induit une nouvelle vague de parasitémie (représenté par \*).

Malgré les énormes avancées dans le domaine de l'immunologie, la variation antigénique presque illimitée lors de l'infection d'une souche unique de trypanosome et la diversité des souches, représentent les principaux obstacles empêchant le développement de vaccins.

## **V.2. Les facteurs circulants**

Les trypanosomes sont capables de sécréter des protéases, des modulateurs de cytokines et des substances immunostimulantes qui agissent sur les lymphocytes T, entraînant une inhibition de la réponse immunitaire et un dérèglement de la production de lymphocyte B. Ces mécanismes contribuent à l'inefficacité de la réponse immunitaire vis-à-vis du parasite.

Exemples:

> Dans l'infection à *T. cong.*, la forme TSg excrète une sialidase qui participe à l'induction d'une anémie chez l'animal infecté [93].

> Des enzymes protéolytiques sont relargées ou présentes en surface. La Trypanopaïne qui est une cystéine protéase, dégrade les immunoglobulines, l'oligopeptidase B et les hormones peptidiques [94-96].

> La calreticuline est une protéine multifonctionnelle présentant une activité immunosuppressive et pro-angiogénique [97]. Pour échapper au système immunitaire inné de l'hôte, le trypanosome inhibe le schéma réactionnel classique des protéines du complément par l'intermédiaire d'une interaction entre la calreticuline et la protéine C1q de l'hôte [98].

## Chapitre B.

### LES STRATEGIES PHARMACEUTIQUES

---

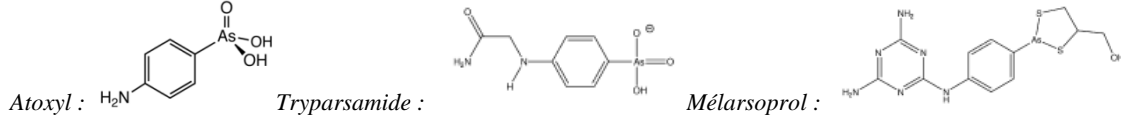
Au cours de la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, les trypanocides étaient rares. Le premier utilisé était un dérivé arsenic : l'acide aminophényl arsenic, commercialisé en 1905 jusqu'en 1925 par les industries Bayer sous le nom Atoxyl®. Il supprimait les parasites du sang, éliminant le risque de transmission. Toutefois, il n'était pas actif sur les parasites dans le LCR car il ne traversait pas la BHE, la maladie continuait ainsi à évoluer. De plus, une conséquence de ce traitement était la cécité par névrite optique. Aujourd'hui, d'autres médicaments ont été mis sur le marché. Néanmoins, aucun ne représente le trypanocide idéal. En effet, ils sont couramment utilisés depuis plus de 40 ans, présentent des effets secondaires graves, nécessitent une prise prolongée et représentent d'importants coûts de production. Dans le domaine de la recherche, la priorité est accordée à la mise au point de nouveaux composés pour remplacer les trypanocides actuels [5]. Toutefois, l'amélioration de l'efficacité de ces molécules est également étudiée par modification de leur structure moléculaire [99] ou en élaborant de nouvelles formes galéniques [100-103].

#### **I. Les chimiothérapies trypanocides**

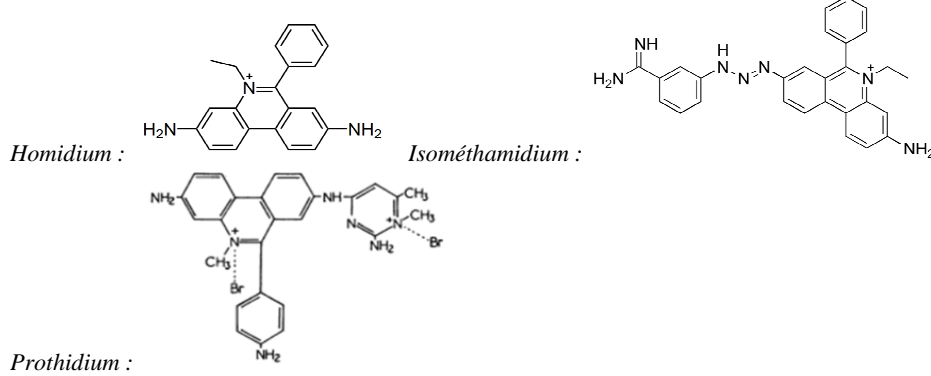
L'étude de la physiologie des agents pathogènes de la TA s'intéresse particulièrement à la variation antigénique, les ancras GPI et les voies métaboliques particulières. Aussi, les principaux trypanocides correspondent à des inhibiteurs du métabolisme du glucose, de la synthèse des polyamines (ODC et la S-adenosyl-L-méthionine decarboxylase), d'autres enzymes nécessaires aux fonctions essentielles à *T.b.* et à des intercalants d'ADN.

##### **I.1. Les traitements homologués**

1. **Les arsenicaux**

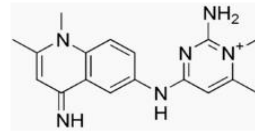


2. **Les phenanthridine**

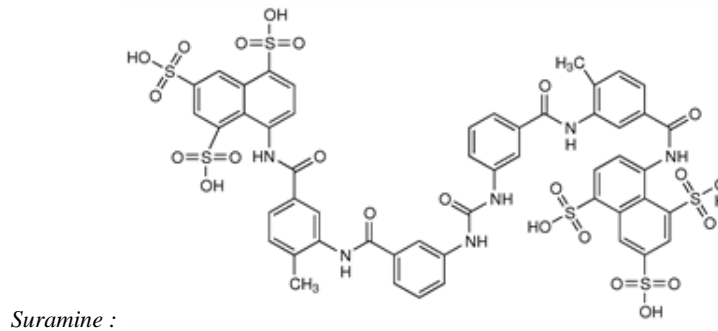


3. **Les antimaliniques**

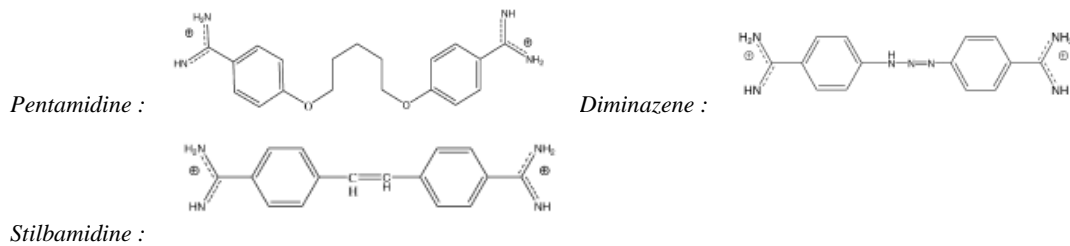
*Quinapyramine* :



4. **Les dérivés polysulfonate de l'urée**

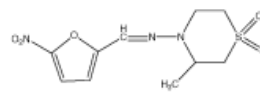


5. **Les diamidines**



6. **Les dérivés nitroimidazoles**

*Nifurtimox* :



7. **Les ornithines**

*Eflornithine* :

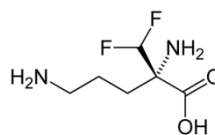


Fig. 11 : Schéma des structures moléculaires des médicaments homologués pour le traitement de la Trypanosomose Africaine



### **I.1.1. Les traitements de la TAA**

Les médicaments thérapeutiques et prophylactiques recommandés pour la prise en charge de la TAA sont le diminazène diacéturate (DMZ), le chlorure d'homidium (HMD) et le chlorure d'isométymidium (ISM). Ils représentent 40 à 50% du marché du médicament vétérinaire dans certains pays endémiques d'Afrique [104].

La quinapyramine (QNP), le pyrithidium, la SRM et le mélarsonine sont principalement utilisés en thérapeutique pour les infections à *T. evansi* chez les équidés, les camélidés et les buffles. La QNP est également utilisée en prophylaxie [105].

Ces molécules ne sont malheureusement pas décrites dans une pharmacopée officielle [104]. L'absence de monographies officielles<sup>16</sup> ne facilite pas l'évaluation et la comparaison des produits. Leur activité varie selon le type de Trypanosomose et leur toxicité est inégale selon les animaux [5].

	<i>T. cong.</i>			<i>T. vivax</i>		<i>T. brucei</i>		<i>T. simiae</i>	<i>T. evansi</i>	
	ruminants	chevaux	chiens	ruminants	chevaux	chevaux	chiens	porcs	chameaux	chevaux
<b>Usage recommandé</b>	DMZ ISM	ISM	ISM	DMZ ISM	ISM	QNP	QNP		QNP	QNP
<b>Usage possible</b>	HMD QNP	HMD DMZ QNP	DMZ QNP	HMD QNP	HMD DMZ	DMZ ISM	DMZ ISM	ISM* QNP+DMZ	SRM DMZ ISM	SRM DMZ ISM

**Tableau 2: Indications des trypanocides curatifs [5]**

\* : Forte dose nécessaire

#### **I.1.1.1. Le diminazène (DMZ)**

Le DMZ est une diamidine aromatique analogue à la pentamidine qui a été introduite sur le marché en 1955 en tant que trypanocide et babesiocide pour le bétail domestique [106]. Cette molécule correspond à deux groupements amidinophenyl reliés par un pont triazene (Fig. 11). Ce groupement est susceptible de se cliver en milieu acide donnant du 4-hydroxybenzamidine et du 4-aminobenzamidine [107].

Le DMZ est commercialisé sous la forme d'un sel de diacéturate (Azidin®, Berenil®, Trypazene®, Ganasag®). Dans une solution aqueuse le composé est stable 2 à 3 jours. La durée de stabilité courte du DMZ nécessite une combinaison avec un stabilisant : le phenyldiméthyl pyrazolone (antipyrine). Une préparation de DMZ en solution peut alors être stockée 10 à 15

<sup>16</sup> La monographie d'une molécule médicamenteuse s'articule en plusieurs points : définition/description de la substance, propriété physico-chimiques (solubilité, pH,...), identification et dosage du principe actif, identification et dosage des impuretés (résidus de synthèse, produits de dégradation) et les normes de qualité.

jours à température ambiante sans perte d'activité du principe actif. Un des objectifs de notre étude est d'ailleurs de protéger le DMZ de sa dégradation afin d'améliorer la durée de stockage de ce principe actif.

L'élimination de *T. cong.* et de *T. vivax* chez les bovins nécessite une administration intramusculaire (i.m.) de 3,5 mg/kg de DMZ. Pour traiter les infections au *T.b.* la dose est de 5 mg/kg. Le DMZ se retrouve concentré dans les sites d'injection, suivi du foie et des reins. Elle présente une variation inter-individuelle importante. La forme sanguine de *T.b.* absorbe le DMZ base par l'intermédiaire presque exclusif du transporteur TbAT<sub>1</sub>. Ce transporteur membranaire des purines est dose dépendante également de la PTM et de l'adénosine [108]. Une diminution de l'absorption du principe actif est due à une expression du transporteur d'adénosine TbAT<sub>1</sub> réduite ou altérée.

Le DMZ est rapidement éliminé du corps principalement par voie rénale, il est utilisé en tant qu'agent thérapeutique et rarement prophylactique. Le DMZ peut présenter une toxicité chez les chameaux et les chiens, surtout à de fortes doses d'injection à partir de 7,5 mg/kg [109, 110].

Il donnerait également des résultats satisfaisant dans la maladie du sommeil (*T.b. gamb.* et *T.b. rhod.*) aux stades 1 [5, 111]. Il est injecté par voie i.m. à raison de 2 cures de 48h d'intervalle à la posologie de 5 à 7 mg/kg. Le DMZ est d'administration moins douloureuse au point d'injection que celle de la pentamidine, le traitement est plus court et peu coûteux. Toutefois, il ne présente pas d'AMM pour le traitement de la TAH.

#### Mécanisme d'action

Le DMZ se lie à l'ADNk. Cette liaison est spécifique et s'effectue dans des sites riches en paire de base adénine-thymine (A-T). A travers cette interaction spécifique, le DMZ inhibe la synthèse d'ARN amorce, résultant en une accumulation des intermédiaires de réplication et inhibe la réplication de l'ADNk. Shapiro T. A. et Englund P. T. ont montré que le DMZ peut également inhiber directement la topoisomérase II de la mitochondrie[112]. Une activité du DMZ au niveau de l'ADN nucléaire n'a pas encore été démontrée mais n'est pas à exclure.

#### **I.1.1.2. L'homidium(HMD) et l'isomémidium (ISM)**

L'HMD est commercialisé depuis 1952 sous la forme de sel de chlorure (Novidium®) ou de sel de bromure (Ethidium®). Le chlorure d'ISM est sur le marché depuis 1961 (Samorin®, Trypamidium®) comme traitement prophylactique et thérapeutique. Ces composés sont des phénanthridines dont l'activité trypanocide a été prouvée depuis plus de 60 ans. Ils sont actifs

contre *T. cong.* et *T. vivax*. l'ISM présente également une efficacité contre les infections à *T. brucei* et *T. evansi* affectant les singes, les chevaux et les chameaux.

L'ISM diffère de l'HMD par la présence du groupement *m*-amidinophenyl-azo-amine [113], qui correspond à un fragment du DMZ (Fig. 11). Il correspond ainsi à une molécule hybride entre le DMZ et l'HMD. L'activité prophylactique de l'HMD est efficace 2 à 19 semaines [114, 115].

#### Mécanisme d'action

Les phenanthridines bloquent la synthèse des acides nucléiques en s'intercalant entre les paires de base d'ADN, en inhibant l'ARN polymérase [116] et l'ADN polymérase [117]. Ils modulent également la biosynthèse des glycoprotéines [118], le métabolisme des lipides [119] et le clivage spécifique des minicercles d'ADNk .

### **I.1.2. Les traitements de la TAH**

Dans la TAH, quatre médicaments sont enregistrés : la suramine sodique (SRM), la pentamidine iséthiocyanate (PTM), le mélarsoprol (MLS) et l'éflornithine (DFMO). Leur efficacité est liée au stade d'évolution de la maladie [120]. La SRM et la PTM sont des traitements de la première phase de la maladie et le MLS et le DFMO, de la seconde. Le nifurtimox (NFT) qui est homologué dans le traitement de la Trypanosomose Américaine, peut être utilisé seul ou en combinaison avec d'autres médicaments particulièrement le DFMO, en rattrapage au traitement par MLS [121].

Dans les zones à *T.b. rhod.*, la chimioprophylaxie n'est pas recommandée car le traitement risque de masquer la maladie au stade précoce, au moment où elle est la plus facile à guérir [5].

#### **I.1.2.1. La pentamidine (PTM)**

La PTM est une diamidine aromatique utilisée depuis 1941 pour traiter la TAH à *T.b. gamb.* en phase hémolympatique. Elle est également efficace pour traiter les Leishmanioses et les pneumopathies à *Pneumocystis jiroveci*<sup>17</sup>. La PTM est préférée à la SRM car elle semble présenter une protection plus durable et elle est plus facile à administrer. La dose unique habituelle à titre prophylactique est de 4 mg/kg en injection i.m..

Elle est commercialisée sous la forme d'un sel de dimésylate (Lomidine®) qui n'est plus utilisé aujourd'hui et d'iséthiocyanate (Pentacarinat®) préféré pour sa meilleure tolérance. Ces sels correspondent à la PTM protonée sur ses deux fonctions amidines. La base est peu soluble

---

<sup>17</sup> Encore appelé de nos jours *Pneumocystis carinii*

dans l'eau où elle cristallise (il en est de même pour le DMZ). La PTM iséthiocyanate est une poudre blanche soluble dans l'eau et l'alcool, surtout à chaud, mais est insoluble dans les solvants organiques.

Lorsque le LCR est normal, la PTM est utilisée en pratiquant jusqu'à 7 à 10 injections i.m. un jour sur deux. Il nécessite une surveillance médicale afin d'ajuster le nombre d'injection en fonction de la parasitémie et des signes cliniques.

La PTM est, en général, bien tolérée, mais, peut présenter des sensations de faiblesse, des vomissements et des douleurs abdominale au cours de la première demi-heure et enfin des réactions hypoglycémiques sévères.

La PTM se lie à 70 % aux protéines plasmatiques. Elle est concentrée dans le cytoplasme des cellules du trypanosome grâce à un transporteur actif. Des souches sont résistantes par suppression de ce mécanisme de transport [122].

La pharmacocinétique de la PTM a été étudiée chez des patients atteints de la maladie du sommeil [123-125]. Elle est injectée en intraveineuse (i.v.) ou en i.m. à une dose de 1,7 à 4,5 mg/kg par jour. La demi-vie d'élimination de la PTM est très longue, plusieurs semaines. La concentration plasmatique maximale après injection i.m. est atteinte en 1 heure et varie énormément, probablement en raison d'une diffusion variable au niveau du point d'injection.

#### Mécanisme d'action

Le mécanisme exact de son action n'est pas encore parfaitement établi. La PTM chargée positivement à pH physiologique, se lie aux polyanions cellulaires (ADN, ARN) notamment au niveau de l'ADNk [126], entraînant une inhibition de la biosynthèse de l'ADN, l'ARN et la transformation des folates. Elle induit des perturbations du métabolisme du glucose, mais également un blocage de la phosphorylation oxydative, et de la synthèse de certaines protéines.

#### **I.1.2.2. La suramine (SRM)**

La SRM (Bayer 205<sup>®</sup>, Moranyl<sup>®</sup>, Germanin<sup>®</sup>) a été synthétisée en 1916 et utilisée en tant que traitement pour les TAH en 1921. La SRM appartient à la famille des uréides complexes qui présente 4 fonctions amides et deux groupements polysulfonate naphtylamine (Fig. 11). Elle est efficace au stade précoce des infections par *T.b. gamb.* et par *T.b. rhod.*

La poudre de SRM est blanchâtre et très hygroscopique; sa solubilité est très importante dans l'eau, modérée dans le méthanol et nulle dans les solvants organiques (éther, chloroforme).

Elle n'est utilisable que par voie intra veineuse (i.v.) lente car elle présente une très faible résorption par voie orale et une grande toxicité par voie sous-cutanée (s.c.) et i.m.. La SRM est utilisée en injection i.v. hebdomadaire à 20 mg/kg pendant 5 à 7 semaines. Elle peut présenter des effets indésirables comme une réaction fébrile et une marche difficile [5].

La SRM présente 6 charges négatives à pH physiologique qui l'empêche de franchir les membranes biologiques hydrophobes. Le taux de liaison aux protéines plasmatiques est très élevé et atteint environ 99,7%. La SRM se dépose dans les tubules rénaux, rendant son utilisation délicate chez les insuffisants rénaux.

#### Mécanisme d'action

Son mécanisme d'action n'est pas totalement compris, toutefois, il semble être dû à son activité inhibitrice vis-à-vis des enzymes glycolitiques contenues dans les glycosomes des parasites. Les enzymes les mieux connues sont la glycérol-3-phosphate oxydase et la glycéraldéhyde-3-phospho-deshydrogénase. Leur inhibition entrainerait une diminution de la production d'ATP, provoquant des troubles métaboliques induisant la destruction du parasite.

#### **I.1.2.3. Le mélarsoprol (MLS)**

Les préparations organo-arsenicaux renferment un atome d'arsenic (As) lié par une liaison covalente à un atome de carbone inclus dans un cycle aromatique. Ils restent les traitements mis à l'honneur car les dérivés de l'arsenic ont longtemps été les seuls à atteindre les parasites localisés dans le SNC.

Le MLS (Arsobal®, Mel B) détrône le tryparsamide, un arsenical pentavalent (As dans un état d'oxydation V) commercialisé en 1920 sous le nom de Tryponarsyl®. Le MLS est un sel d'arsenic trivalent (As dans un état d'oxydation III) qui est très efficace, mais également très toxique [127] (5% de mortalité induite).

Le MLS est utilisé en première intention dans le traitement de la phase méningo-encéphalitique. Il est en solution à 36 mg/ml dans du propylène glycol qui est reconstituée de manière extemporanée car il n'est pas stable [128]. La conservation des ampoules se fait à une température inférieure à 25°C à l'abri de la lumière. Le traitement s'effectue par plusieurs injections lentes et strictement en i.v.. Le nombre de cures est dépendant de la parasitémie du LCR.

Le MLS se présente sous forme de poudre blanche ou gris-clair. Il est insoluble dans l'eau, le méthanol, l'éthanol, le glycérol, mais très légèrement soluble dans l'éther et le dichlorométhane. Il présente donc un caractère apolaire qui expliquera son possible passage à travers la BHE. Il est instable en milieu alcalin.

La concentration plasmatique du MLS diminue rapidement avec un temps de demi-vie de 35 h. Les concentrations observées au niveau cérébral sont très inférieures aux concentrations plasmatiques (de l'ordre du centième) mais restent suffisantes pour avoir un effet trypanocide.

L'élimination du MLS se fait par voie rénale. La molécule s'élimine relativement lentement et s'accumule dans l'organisme lorsqu'on pratique des injections fréquentes.

#### Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action trypanocide du MLS n'a pas encore été élucidé. Toutefois, de nombreux éléments nous permettent d'élaborer des hypothèses. Il induit un blocage d'enzyme participant à la glycolyse nécessaire à l'apport d'énergie aux trypanosomes : pyruvate-kinases et la glycérol-3-phospho-déshydrogénase. Il inhibe les enzymes présentant des groupements thiols situés sur leur site actif. La cible pourrait être le trypanothion inhibant la trypanothion reductase exposant le trypanosome aux radicaux libres toxiques.

#### **I.1.2.4. L'éflornithine**

La molécule de diméthyl-fluoro-ornithine (DFMO, Ordinyl®) a été originairement développée dans les années 1970 comme un médicament anti-cancéreux. Depuis 1990, elle a permis d'apporter une alternative aux échecs du traitement au MLS pour traiter la TAH à *T.b. gamb.*. Le métabolisme des polyamines est différent pour chaque sous-espèce de parasites. Cette différence explique que contrairement à *T.b. gamb.*, *T.b. rhod.* n'est que peu sensible à l'éflornithine.

Elle représente un grand intérêt thérapeutique grâce à sa grande efficacité et sa bonne tolérance. Elle est utilisée en perfusions quotidiennes durant une cure de deux semaines en moyenne par voie parentérale à 100 mg/kg. Elle nécessite du personnel médical qualifié et beaucoup de matériel. Ce traitement bien qu'efficace est également très onéreux d'où une utilisation limitée. Il est réservé aux sujets présentant une résistance au MLS ou ayant des antécédents d'encéphalopathie arsenicale.

Le DFMO comporte une chaîne de 4 carbones dont l'un est porteur de 3 fonctions : difluorométhane, carboxilique et amine (Fig. 11). Ce carbone est donc asymétrique d'où l'énantiométrie du DFMO. En thérapeutique, chlorhydrate d'éflornithine (monohydraté). Il se présente sous forme de cristaux dont le point de fusion se situe à 183°C. Le DFMO est peu soluble dans l'alcool mais l'hydrate d'éflornithine est très soluble dans l'eau.

Son administration est réalisée par voie parentérale. Par voie i.v. la distribution de la molécule est rapide mais le volume de distribution est faible (0,34 l/kg).

Son passage dans le LCR est relativement important. Sa concentration reste cependant inférieure à la concentration sanguine. Son élimination présente une cinétique linéaire et se réalise par voie urinaire de manière rapide. Son temps de demi-vie est de 3,4 h. Il présente peu de variation inter-individuelle. Sa forme éliminée est inchangée, d'où un ajustement nécessaire de la posologie chez les personnes présentant une insuffisance rénale.

#### Mécanisme d'action

Son mécanisme d'action est très complexe. Le DFMO ne se fixe pas spécifiquement sur les protéines plasmatiques. Il est un inhibiteur irréversible de l'ornithine décarboxylase, une enzyme essentielle à la biosynthèse des polyamines.

#### ***1.1.2.5. Le nifurtimox***

Le nifurtimox (Lampit®) appartient à la famille des nitrofurane. Il est utilisé par voie orale de 12,5 à 17 mg/kg/jour pendant 60 jours. Il est utilisé dans le traitement de la maladie de Chagas. Il est actif contre *T.b. gamb.* et *T.b. rhod.*

Le NFT pénètre dans le parasite par diffusion passive à travers la membrane plasmique. Il présente une bonne résorption orale. Le NFT se présente comme une alternative intéressante dans la thérapeutique de la TAH, notamment dans le cas d'arsenico-résistance car il franchit la BHE.

#### Mécanisme d'action

Son mécanisme d'action est lié au groupement nitro (-NO<sub>2</sub>) de la molécule. La réduction du groupement nitro donne un radical libre (-NO<sub>2</sub>·) qui génère différents métabolites (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO·) qui sont toxiques pour le parasite. Les altérations subies par l'ADN et les protéines entraînent la mort du parasite.

*Les traitements chimiothérapeutiques présentent de nombreux inconvénients. En plus d'être des produits manufacturés souvent chers, ces molécules médicamenteuses sous leur forme libre, présentent une efficacité thérapeutique limitée.*

## **I.2. Les limites des chimiothérapies trypanocides**

L'efficacité de l'arsenal chimiothérapeutique trypanocide est quasi inexistante. Les coûts de production peuvent être exorbitants (ex. DFMO), leur fabrication toxique pour l'environnement (les arsenics) et même l'administration du médicament pose un problème de terrain. Aussi, la disponibilité à long terme de certains médicaments n'est pas garantie malgré les accords de l'OMS sur la franchise des frais d'approvisionnement (PTM, SRM, DFMO et MLS) [6].

Ces facteurs se rajoutent aux limites directement liées à leur efficacité. En effet, ces médicaments sous leur forme galénique la plus simple, présentent des effets secondaires non négligeables, une biodisponibilité cérébrale souvent inexistante et peuvent faire l'objet d'échec de traitement dû à une résistance de la souche parasitaire traitée.

### **I.1.1. Les effets indésirables et iatrogéniques**

Les traitements présentent des effets secondaires importants : des thromboses veineuses et des nécroses sous-cutanées au niveau du site d'injection (thrombophlébites), dues à la faible solubilité du produit. Les diamidines nécessitent plusieurs injections parentérales du fait d'un temps de demi-vie sanguine trop court, empêchant une efficacité prophylactique des traitements.

Le MLS est un composé dangereux induisant dans 10% des cas une encéphalopathie réactionnelle pouvant entraîner la mort dans 2 à 5% des cas. Ces effets indésirables s'expliquent par son faible index thérapeutique avec un seuil de toxicité proche du seuil d'efficacité.

L'activité d'un trypanocide peut varier selon des caractères inter-individuels. En effet, le taux d'immunoglobulines circulantes chez les malades augmente la densité des protéines plasmatiques. Cette concentration varie également en fonction de l'état physique du patient (malnutrition). Les effets indésirables des trypanocides sont dus en particulier à leur élimination très lente (les diamidines, les phenanthridines, la SRM). Il présente un phénomène d'accumulation qui sera corrélé à leur toxicité.

### **I.1.2. Le franchissement de la BHE**

La TA fait partie des pathologies du SNC qui présentent l'inconvénient du franchissement de la BHE. En effet, les parasites ayant traversé la BHE, restent viables et sont capables de réinfecter le corps de l'hôte même après traitement. Le cerveau constitue ainsi un réservoir du parasite pouvant induire des rechutes [129].



En effet, à la phase méningo-encéphalitique, le parasite siège dans le SNC protégé par les jonctions serrées des cellules endothéliales cérébrales. Les molécules médicamenteuses nécessitent alors des transporteurs afin de franchir la BHE pour atteindre le trypanosome.

#### ***1.1.2.1. Description de la BHE***

Cet obstacle est localisé au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux représentant une interface d'environ 20 m<sup>2</sup> entre le sang circulant et l'espace extracellulaire cérébral (Fig. 12) [130]. Son rôle primaire est le maintien de l'homéostasie cérébrale.

##### **- Barrière physique**

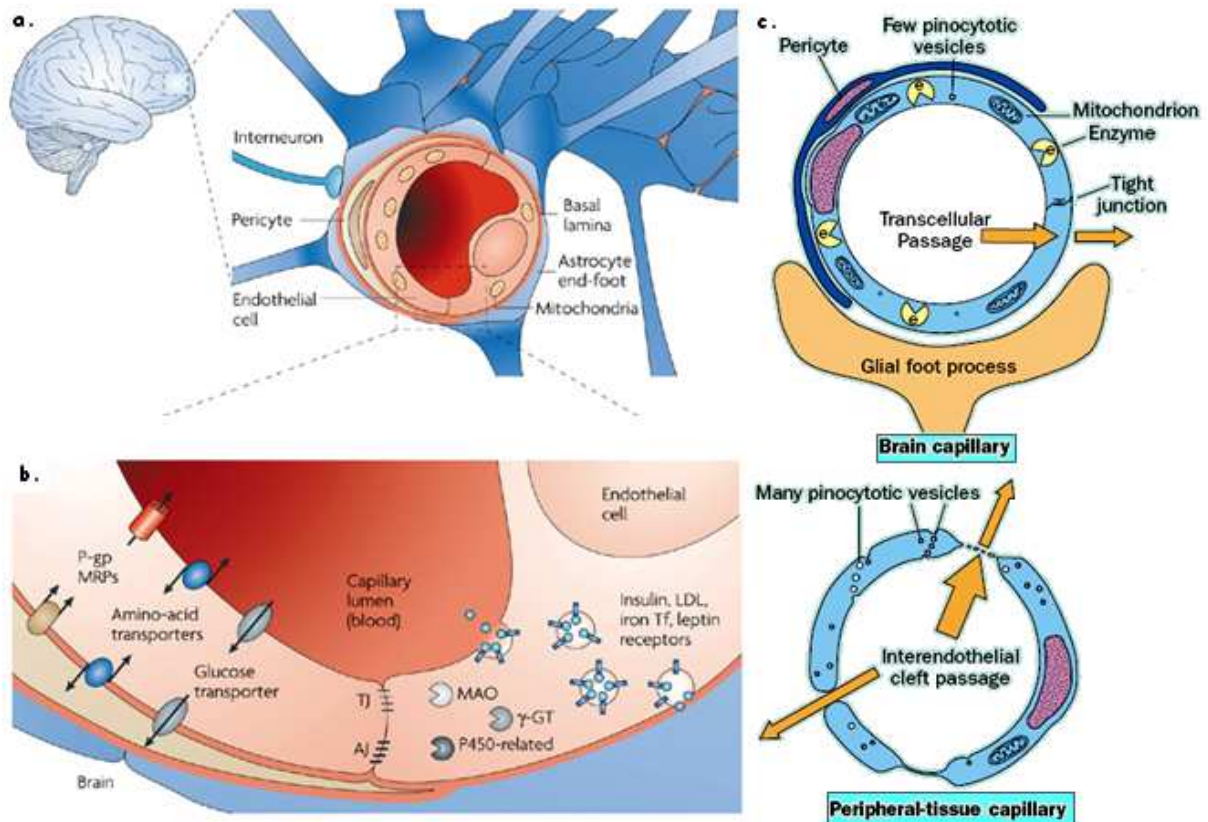
La BHE est composée de cellules endothéliales qui composent un endothélium de type continu localisé au niveau du parenchyme cérébral [131]. Ces cellules sont dotées de caractéristiques morphologiques permettant de les différencier de celles de l'endothélium périphérique. Elles forment une monocouche continue autour de la lumière des capillaires et expriment peu de vésicules d'endocytose et de pinocytose limitant ainsi le flux transcellulaire. Ces cellules sont associées par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes limitant le flux paracellulaire (Fig. 12) [132, 133]. L'endothélium cérébral présente des interactions avec les péricytes, les astrocytes, et les neurones qui contribuent à la régulation du fonctionnement de la BHE dans les conditions physiologiques et pathologiques [134]. D'un point de vue structural, les péricytes sont séparés de la face abluminale des cellules endothéliales par une matrice extracellulaire appelée la lame basale [135]. Elle présente une structure trilamellaire composée principalement de collagène de type IV, de laminines et d'héparane sulfates [136]. Les astrocytes émettent des prolongements appelés pieds astrocytaires qui recouvre 89% du périmètre des capillaires cérébraux, formant une structure dite en rosette [137, 138].

##### **- Barrière métabolique**

En plus d'être une barrière physique, la BHE présente les propriétés d'une barrière métabolique par l'expression d'enzymes particulières et de pompes d'efflux responsables de phénomènes de multi-résistance qui est un obstacle non négligeable pour l'administration de médicaments [139-141]. L'endothélium cérébral présente la MAO (monoamine oxydase), les cytochromes P450 monooxygénases, les NADPH-cytochrome P450 réductases, les phosphatases alcalines, les glucosyl transférases, les glutathions peroxidases et l'époxyde hydrolase restreignant le passage des xénobiotiques vers le cerveau.

Un grand nombre de médicaments liposolubles ne pénètrent que faiblement dans le parenchyme cérébral en raison de leur élimination par les transporteurs **ABC** (ATP-binding cassette). Cette famille de transporteurs comprend trois grandes sous-familles : **MDR**

(Multidrug Resistance), **BCRP** (Breast Cancer Resistance Proteins) et les **MRP** (Multidrug Resistance associated proteins). Plusieurs membres de la famille des **OATP** (Organic Anion Transporting Peptides) et de la famille des **OAT** (Organic Anion Transporters) participent à l'efflux actif au niveau de la BHE [139].



**Fig. 12: Structure de la Barrière hémato-encéphalique**

La BHE est constituée de cellules endothéliales, au niveau des capillaires cérébraux, interagissant avec des éléments périvasculaires comme la lame basale, des extrémités d'astrocyte, des neurones périvasculaires et des péricytes (a.) [142]. Les cellules endothéliales cérébrales présentent une étanchéité paracellulaire assurée par l'interaction de protéines transmembranaires formant des jonctions serrées (TJ) et des jonctions adhérentes (AJ) (b.). Ces complexes moléculaires rendent le cerveau inaccessible pour les molécules polaires, si ce n'est par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques qui régulent le microenvironnement cérébral. Les grosses molécules tels que les anticorps, les lipoprotéines, les protéines et les peptides peuvent également être transférés dans le compartiment cérébral par transcytose soit médiée par récepteur, soit médiée par adsorption non-spécifique. Les récepteurs pour l'insuline, les lipoprotéines à faible densité (LDL), la transferrine et la leptine, participent tous au phénomène de la transcytose. [142].

Les capillaires cérébraux diffèrent des capillaires périphériques (c.). Les capillaires périphériques présentent un tissu endothélial discontinu et donc plus perméable. [131].

P-gp, P-glycoprotéine; MRP, multidrug resistance-associated protein family

La P-glycoprotéine fait partie de la famille des MRP. Elle présente une grande variété de substrats qui sont des bases faibles lipophiles (doxorubicine, tamoxifène), des cations lipophiles (rhodamine 123), des composés lipophiles neutres polycycliques (colchicine, progestérone), des molécules amphiphiles (triton x100) ou des peptides hydrophobes (cyclosporine A).

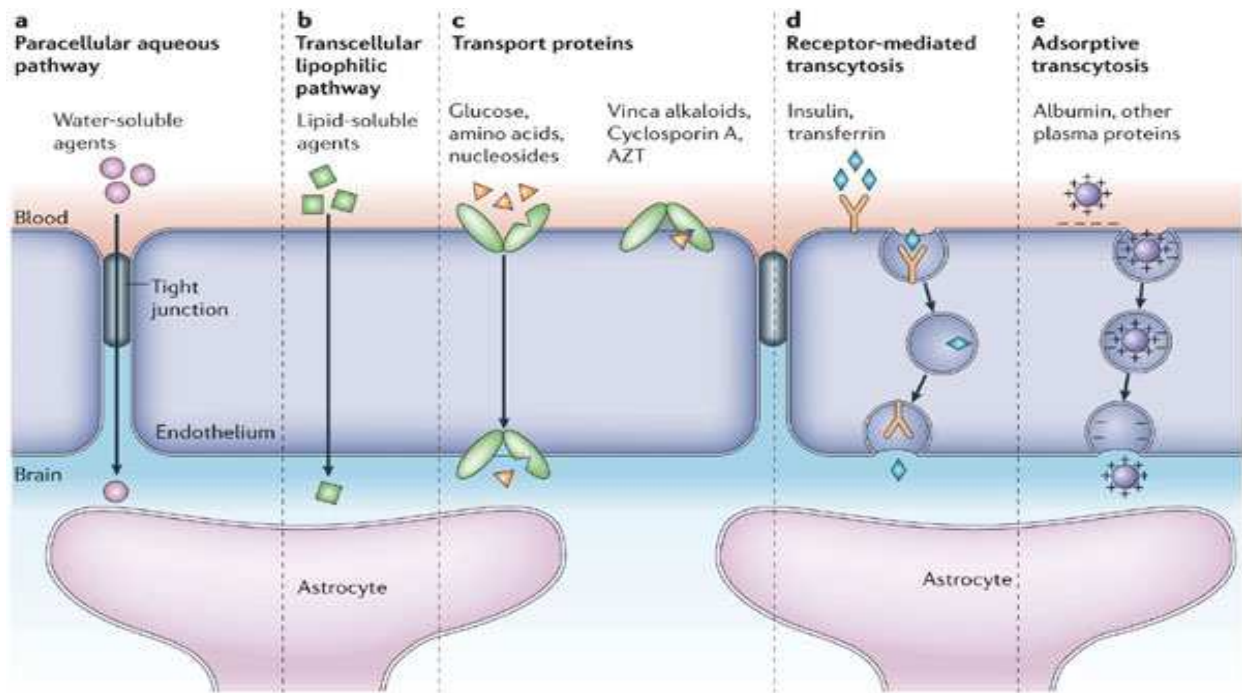
Ainsi, la BHE est une barrière biologique restrictive de la diffusion non spécifique des composés du sang vers le parenchyme cérébral.

#### ***1.1.2.2. Les voies de transport au niveau de la BHE***

Le passage de molécules à travers la BHE peut s'effectuer soit par diffusion passive ou facilitée, soit par un transport actif. Des transporteurs protéiques permettent le passage de part et d'autre de la BHE des ions, des monosaccharides et des acides aminés. Ces transporteurs sont multiples et se répartissent sur les faces luminales et abluminales des cellules endothéliales [143]. D'autre part, les cellules endothéliales sont dotées de domaines particuliers permettant le transport de peptides, de protéines et de lipides médié par récepteur. Toutefois, les mécanismes ainsi que les structures cellulaires proposées pour expliquer le transport des complexes ligand/ récepteur à travers les capillaires cérébraux pour atteindre le compartiment abluminale (parenchyme cérébral), ne sont pas clairement élucidés.

La délivrance de fer vers le cerveau met en jeu la transcytose du complexe transferrine différique/  $R^Tf$ . Toutefois, le mécanisme de passage du fer de la cellule endothéliale vers le parenchyme cérébral n'est pas parfaitement décrit. Néanmoins, la reconnaissance de la transferrine (Tf) par le  $R^Tf$  et l'endocytose du complexe (Tf/  $R^Tf$ ), représente l'élément commun à l'ensemble des hypothèses expliquant la transcytose du fer vers la face abluminale de la BHE [144, 145]. Il a également été montré *in vitro* que le fer peut pénétrer dans le compartiment cérébral en se liant à d'autres protéines comme la lactoferrine ou la mélanotransferrine. Leur transcytose s'effectuerait par la reconnaissance avec un récepteur différent de celui de la transferrine, le récepteur LRP (ou récepteur  $\alpha$ -2 macroglobuline) [146, 147].

Le transport de protéines par transcytose a essentiellement été démontré dans le cerveau pour l'insuline et la Tf [148-150]. Les récepteurs à l'insuline, aux IGF (Insulin Growth Factor), à la leptine, aux LDL (Low Density Lipoprotein), aux HDL (High Density Lipoprotein) et aux lectines sont aussi détectés au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux [130].



**Fig. 13: Schéma des cellules endothéliales qui forment la BHE et leur association avec les pieds astrocytaires [151]**

Les principaux passages moléculaires pour traverser la BHE sont représentés. En a, les jonctions serrées restreignent fortement la pénétration des composés solubles dans l'eau, incluant les médicaments polaires. Cependant, la grande surface de l'endothélium offre la possibilité aux agents liposolubles de diffuser à travers la membrane (b). L'endothélium est pourvu de protéines transporteurs pour le glucose, les acides aminés, les bases purines, les nucléosides, la choline et autres substances (c). Beaucoup d'entre elles sont énergie dépendante (ex : la P-glycoprotéine) et jouent un rôle d'efflux. Certaines protéines, comme l'insuline et la transferrine, induisent une endocytose médiée par un récepteur spécifique suivi d'une transcytose (d). Les protéines plasmatiques natives comme l'albumine sont faiblement transportées, mais l'ionisation peut augmenter leur passage par endocytose médiée par adsorption, puis transcytose (e). La délivrance de médicaments au cerveau dépend des routes b à e mais essentiellement la b. AZT, azidothymidine

### ***1.1.2.3. Facteurs limitants des trypanocides***

Le franchissement de la BHE par une molécule est dépendant de son coefficient de solubilité lipidique, de son poids moléculaire et de sa forme [130]. Les molécules faiblement lipophiles sont généralement exclues si elles excèdent un poids moléculaire de 500 Da. Les substances hydrophiles (ions, protéines et glucides) ne peuvent franchir la BHE par simple diffusion.

Le MLS est ainsi le seul médicament utilisable pour le traitement en routine de la phase meningo-encéphalique de la maladie.



Ainsi, le développement de résistance face au traitement à base de diamidine s'effectue principalement par une altération ou une absence d'expression du transporteur membranaire du gène P2.

*La recherche s'oriente vers la production de composés très actifs, faiblement toxiques, faciles à administrer et bon marché. L'attente de la découverte d'une nouvelle molécule médicamenteuse contre la TAH, explique que les scientifiques étudient l'amélioration de l'efficacité de médicaments existants en modifiant leur formulation pharmaceutique. L'objectif est de développer une forme galénique ayant une administration aisée, une capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique, une efficacité à tous les stades de l'affection, atoxique, facile à conserver et d'un coût réduit.*

## **II. Les Systèmes de Délivrance de Médicaments trypanocides**

Le développement de systèmes de délivrance d'agents antiparasitaires correspond à une nouvelle stratégie galénique. Elle consiste à mettre au point un système à libération prolongée ou un transporteur submicroscopique, capables de contenir une quantité suffisante de molécules médicamenteuses afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique. Les avantages escomptés de nanovecteurs sont une libération contrôlée du principe actif et un adressage spécifique à l'organe, au tissu ou à la cellule cible pour limiter les effets secondaires.

Lors du traitement d'une infection à *T.b.*, la formulation médicamenteuse doit présenter une combinaison de propriétés bien précises. Le médicament doit être capable de franchir une succession de barrières biologiques dont la BHE afin de délivrer le principe actif au niveau des trypanosomes nichés au niveau du système hémato-lymphatique et du cerveau. La mise au point de vecteurs nanoparticulaires capables d'atteindre leur cible depuis leur site d'administration est ainsi extrêmement complexe, car leurs propriétés doivent leur permettre de s'affranchir de multiples interactions et perturbations physico-chimiques et biologiques.

Les nanosystèmes trypanocides devraient permettre d'améliorer la voie d'administration du médicament (parentérale ou orale), de réduire leur dose efficace, de franchir les barrières biologiques et enfin de pallier aux résistances médicamenteuses de certaines souches de trypanosome. Toutefois l'homologation d'une nouvelle formulation médicamenteuse nécessite la preuve d'une efficacité *in vivo*, l'absence d'effet mutagène et de toxicité sur différentes espèces d'animaux.

---

Nous avons réalisé une revue qui reprend les activités de recherche de SDM trypanocides : « *Drug Delivery Systems in the Treatment of African Trypanosomiasis Infections* ».

Les liposomes sont à la fois présentés en tant qu'agent trypanocide auquel peut être associé à l'intérieur ou en surface des composés diamidines, phénanthridines ou dérivés arseniques. La cyclodextrine est principalement utilisée pour améliorer la solubilisation de molécules médicamenteuses hydrophobes. Enfin les nanoparticules sont étudiées dans l'espoir de développer un vecteur thérapeutique à ciblage parasite spécifique.

**Ref. : M. Kroubi et al., Expert Opinion on Drug Delivery**

# RESULTATS

---



## **RESULTATS :**

### **FORMULATION NANOPARTICULAIRE DE DIMINAZENE**

---

Notre projet de recherche a porté sur le développement d'une formulation nanoparticulaire de DMZ à base de NP polysaccharidique cationiques (NP<sup>+</sup>).

Notre travail a été entrepris suivant ces trois axes : (i) l'élaboration d'un système nanoparticulaire amphiphile, (ii) la mise au point d'un processus d'encapsulation du DMZ et sa caractérisation, et (iii) l'évaluation biologique du système obtenu sur un modèle *in vitro* de mise en culture de *Trypanosoma brucei brucei* et sur un modèle murin.

Nous avons étudié, au préalable, les meilleures conditions opératoires afin de réaliser cette formulation. Le DMZ diacéturate qui est la forme pharmaceutique mise sur le marché, est une molécule hydrophile qui s'associe très mal aux NP<sup>+</sup>. Aussi, nous avons choisi d'utiliser le DMZ base (DMZ b) dont le caractère hydrophobe est plus marqué et qui s'associe avec les NP<sup>+</sup> lors de l'ajout de dipalmitoylphosphatidyl glycérol (DPPG) dans sa matrice. Nous avons recherché le solvant idéal du DMZ b pour notre formulation. L'éthanol était un bon choix de solvant dans la mesure où il est également utilisé lors de la solubilisation du DPPG et qu'il peut être éliminé à la fin du procédé par dialyse. Toutefois, le mélange éthanol/eau favorise l'oxydation du DMZ b. Aussi, nous avons plutôt choisi le propylène glycol qui solubilise le DMZ b à 70 mg/ml, à température ambiante. L'ajout du principe actif dans les NPL70 (NP<sup>+</sup> contenant 70% DPPG/NP<sup>+</sup> poids/poids) peut s'effectuer soit durant le chargement en DPPG des NP<sup>+</sup> (*in process*), soit après (*post-loading*).

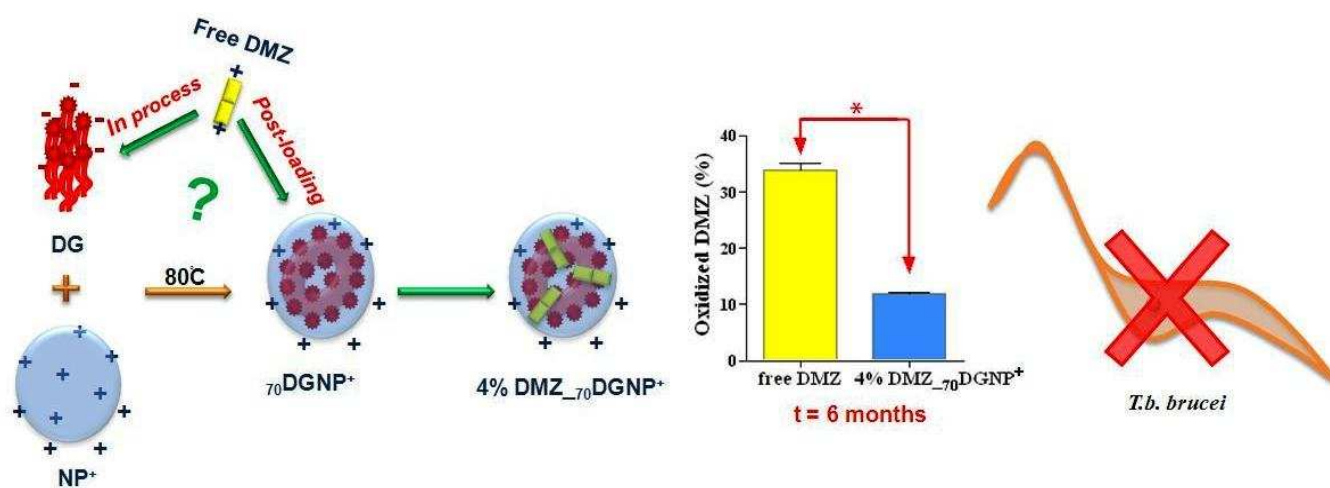
Dans l'article qui suit, nous présentons les résultats obtenus lors de cette étude, mais également le chargement maximal des NPL70 en DMZ, l'effet protecteur des NPL70 vis-à-vis du DMZ b et l'évaluation de l'activité trypanocide *in vitro* et *in vivo* sur un modèle murin de la TA aiguë.

## Article 1:

### Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African Trypanosomiasis

Ref.: M. Kroubi et al., Nanotechnology, 21 (50) : 505102-10, Nov 2010

#### GRAPHICAL ABSTRACT



### In vivo tests

➤ *Protocol: In vivo assessment of test formulations*

Mice were infected i.p. with  $10^3$  parasites. On day 2 post-infection, three groups of 8 mice received, respectively, an i.p. injection of solvent (negative control group), DMZ diac (positive control group) or 2% DMZ<sub>70</sub>DGNP<sup>+</sup> (test group). The DMZ concentration was 3 mg/kg body weight. Infections were monitored daily by microscopic examination of tail blood and parasitemias were performed according to a method described by Herbert and Lumsden.

➤ Results

Traitement	Dose de DMZ (mg/kg)	DMZ (µg/Souris traitées)	NP <sup>+</sup> (mg/Souris traitées)	Souris vivantes/Souris traitées
Solvant	0	0	0	0/8
NPL70	0	0	5,4	0/8
DMZ diac.	3	75	0	8/8
DMZ_NPL70	3	75	5,4	8/8

**Table:** *In vivo* effect of 2% DMZ<sub>70</sub>DGNP<sup>+</sup>

Mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with a suspension containing  $5 \times 10^3$  parasites (*Trypanosoma brucei brucei*) of the strains : Antat 1.1 and 1.9. On the second day post-infection, animals received i.p. solvent, DMZ diac, or 2% DMZ<sub>70</sub>DGNP<sup>+</sup> (8 mice per group). Surviving mice were considered cured when no parasites were found in blood at 4 months post-infection.

➤ *Comments*

In the *in vivo* study, the parasitemia was assessed daily and mice were treated when parasite counts were around  $10^6$ /ml. One day later, no parasites were found in any of the infected mice groups receiving DMZ, either free or  $^{70}\text{DGNP}^+$  loaded DMZ. The positive control (DMZ diac) and  $\text{DMZ}_{-70}\text{DGNP}^+$  were both effective. In fact, all mice were cured after treatment with a single dose (DMZ dose of 3 mg/kg body weight) while all solvent-injected mice (negative controls) died 4 days later (Table). Most of the mice receiving a lower dose of DMZ (free or NP loaded) survived one or two days more than solvent-treated infected mice (data not shown).

In order to potentially improve nanoparticle efficacy we are planning to prepare  $^{70}\text{DGNP}^+$  DMZ formulations of lower size. Further formulations and tests are currently under preparation to confirm these hypotheses.

## DISCUSSION

---

## DISCUSSION

---

La TA est une maladie tropicale endémique en Afrique subsaharienne. L'évolution de cette maladie est dépendante de la sous-espèce du trypanosome infectieux. Dans le corps de l'hôte définitif, son développement est favorisé par sa mobilité physique grâce à son flagelle, par son arsenal invasif d'excrétion/ sécrétion (ex : facteurs circulants immunomodulateurs) et par sa variation antigénique. Ce stratagème de dissémination inactive le système immunitaire de l'hôte et rend le développement de vaccins très compliqué.

C'est pourquoi, la prise en charge de la TA est tributaire des molécules trypanocides mises sur le marché. Néanmoins, elles sont peu nombreuses, présentent une efficacité limitée et une toxicité non négligeable [6, 161, 162]. En effet, l'administration de mélarsoprol au malade, induit des effets secondaires sévères (encéphalopathie mortelle). Les diamidines présentent un temps de demi-vie de circulation sanguine court, du fait d'une distribution trop large, et leur élimination est lente. Aussi, la dose efficace de ces médicaments est importante et leur administration répétée favorise les effets toxiques par accumulation du médicament dans les tissus sains. Enfin, beaucoup d'échec de traitements sont dus à l'incapacité de molécules médicamenteuses à traverser la BHE, pour atteindre les parasites localisées dans le LCR.

L'intérêt majeur du développement de Système de Délivrance de Médicaments (SDM) trypanocides, est la modification des propriétés : Administration/ Libération/ Distribution/ Métabolisme/ Elimination de la molécule active nouvellement formulée. En principe, ils tendent à associer l'augmentation de sa biodisponibilité, à l'optimisation de sa biodistribution.

Lors de l'étude bibliographique des SDM trypanocides pour traiter la TA (cf : revue), nous avons pu relever une variété de systèmes dont les propriétés principales sont une libération prolongée, une libération contrôlée ou une distribution ciblée des composés actifs intégrés dans leur structure.

Les dispositifs à libération prolongée sont principalement incarnés par les implants (3 mm/ 3 cm) à usage sous-cutané. Ils permettent d'augmenter le temps d'efficacité prophylactique des médicaments (ISM, HMD), et donc, par la même occasion, de diminuer le nombre d'injections à infliger aux patients [163-166]. Cependant, ces dispositifs n'améliorent pas la biodisponibilité cérébrale des molécules actives associées.

Les SDM appropriés à l'optimisation de la biodistribution de principes actifs se caractérisent par leur structure supramoléculaire (< 1 µm). Les liposomes, les micelles et les nanoparticules (NP) qui se distinguent par leur structure interne de type matricielle (nanosphère) ou de type vésiculaire (nanocapsule), représentent les catégories de SDM les plus utilisées. La libération du médicament associé, sera fonction de la nature des composantes et de la structure du système. Elle fera suite soit à une dissociation des composantes du SDM, soit à une dégradation de sa matrice ou de sa coque, soit suite à une diffusion du médicament de sa matrice. Ces phénomènes peuvent être influencés par le pH, la température ou la concentration sodique du microenvironnement du système, d'où une possibilité de maîtrise de la cinétique de libération du médicament. Cette propriété est ainsi, dépendante de la nature et de la structure du SDM mais également, de celle des molécules actives associées (masse moléculaire, point isoélectrique et hydrophobicité).

La délivrance ciblée d'un médicament est, quant à elle, principalement dépendante des caractéristiques physico-chimiques du système qui se caractérise par sa taille, son potentiel zêta et ses propriétés de surface (couche stérique, fonctionnalisation). Ces SDM visent à franchir les barrières biologiques qui s'intercalent entre le médicament et son site d'action situé dans le corps du trypanosome infectieux. En fonction de la localisation du parasite, le dispositif devra libérer la molécule active dans le sang, dans la lymphe, dans le LCR, et au mieux dans le cytoplasme du parasite. Dans ce sens, la catégorie de SDM la plus prometteuse, est le vecteur thérapeutique de taille nanométrique (< 100 nm) à administration parentérale [167-170].

Notre projet de recherche & développement d'une formulation trypanocide s'est inscrit dans cette optique. En effet, nous avons développé une formulation de DMZ base (b) à l'aide de nanoparticules polysaccharidiques cationiques (NP<sup>+</sup>) de taille < 100 nm. L'objectif de cette nouvelle forme galénique du DMZ était d'augmenter son efficacité thérapeutique à travers sa biodisponibilité et sa biodistribution, en vue d'apporter une commodité d'emploi du DMZ pour traiter la TAA, voire la TAH. Dans un premier temps, nous avons étudié l'**indice de saturation des NP<sup>+</sup> en DMZ b** en fonction de l'ajout de dipalmitoyl phosphatidyl glycérol (DPPG) dans les NP<sup>+</sup>, du procédé de formulation (*in process versus post-loading*) et du solvant choisi de DMZ b. La **stabilité chimique du DMZ** formulé a été vérifiée en fonction des paramètres testés et en fonction du **temps de stockage** de la formulation à 4°C durant 6 mois. Enfin, l'efficacité de notre formulation colloïdale de DMZ a été comparée au DMZ diacéturate lors de tests *in vitro* et *in vivo* sur un modèle aigu de TA.

## I. Préparation et caractérisation des NP<sup>+</sup>

Les NP<sup>+</sup> que nous utilisons, sont préparées à l'aide de maltodextrine (Glucidex®), un mélange de maltose et d'oligosaccharides issus d'une hydrolyse enzymatique partielle d'amidon de maïs. Elle se caractérise par ses chaînes linéaires  $\alpha$  1-4 D-glucose de longueurs différentes. L'utilisation de la maltodextrine comme excipient, est autorisée par la FDA (Food and Drug Administration) et l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA). En effet, en condition physiologique, ce polysaccharide produit principalement, du D-glucose. Toutefois, cette réaction d'hydrolyse nécessite l'intervention d'enzymes, d'où, le faible pouvoir sucrant de la maltodextrine.

Le procédé de préparation des NP<sup>+</sup> est défini dans le brevet US 2002/0168408 A1 [171]. Il implique une étape de **réticulation à l'épichlorhydrine (EPI)** de la maltodextrine en milieu alcalin, une étape de **fonctionnalisation** par greffage de groupement ammonium quaternaire à l'aide de glycidyltriméthylammonium chloride (GTMA), une étape de **broyage** du gel par homogénéisation à haute pression (1 500 Bars) et enfin, une étape de **purification** par ultrafiltration sur 300 kDa (élimination des résidus de synthèse et des sels) [172-174]. Ce protocole a été établi de telle sorte que les NP<sup>+</sup> soient en suspension dans de l'eau ultra pure et qu'elles représentent une population monodisperse de  $60 \pm 10$  nm de diamètre avec un potentiel zêta de  $+25 \pm 5$  mV. Aussi, un tel procédé, nécessite divers dispositifs d'analyse : pH, pression, taille des particules, potentiel zêta, concentration des ions chlorure du milieu, ...

Dans le domaine alimentaire, l'amidon modifié par voie chimique, est utilisé comme agent épaississant<sup>18</sup>. En industrie de dépollution, il est utilisé en tant qu'agent d'adsorption [175]. Ces fonctions prêtées à l'amidon réticulé, sont permises grâce à sa structure tridimensionnelle en réseau qui lui confère des propriétés diffusionnelles<sup>19</sup> (caractéristiques des liquides) et cohésives (caractéristiques des solides) [176]. Ces propriétés dépendent essentiellement de la maîtrise des conditions opératoires de synthèse et, en particulier, du taux de réticulation de l'amidon. Delval F. et *al.* ont étudié la structure d'amidons réticulés par de l'EPI [175, 177]. Par spectrométrie RMN à l'état solide, ils distinguent des zones amorphes et des zones cristallines, signes d'une structure hétérogène de l'hydrogel. Ces particules d'amidon présenteraient un cœur relativement réticulé et rigide, et une surface peu réticulée et mobile [176].

---

<sup>18</sup> Il est considéré comme additif à la différence des ingrédients. Son utilisation est alors régie par la Directive 95/2/CE modifiée, transposée en droit français par l'Arrêté Ministériel du 2/10/1997. Les doses utilisées relèvent du principe du *quantum satis*

<sup>19</sup> Propriété de rétention



Ces études permettent d'imaginer la structure interne des NP<sup>+</sup> constituant des nanosphères poreuses [178]. Elles se distinguent des vecteurs liposomaux qui ont tendance à décanter en solution (phénomène favorisé par des forces de van der Waals) et à s'agréger dans des conditions physiologiques. En effet, les NP<sup>+</sup> restent stables en solution grâce à leur structure hydrophile poreuse (caractère diffusionnel) et aux répulsions électrostatiques entre les NP<sup>+</sup>. Lors de leur stockage, les NP<sup>+</sup> peuvent être conservées soit sous forme lyophilisée, sans ajout de cryoconservateur, à température (T°C) ambiante ; soit en solution dans des conditions stériles (filtration sur 0,2 µm).

Les propriétés de rétention des NP<sup>+</sup> ont été étudiées. Des molécules anioniques s'associent aisément avec les NP<sup>+</sup> sans perturbation du potentiel zêta, ni de sa taille [179, 180]. Paillard A. et al. [180] ont étudié l'association de BSA (65 kDa, pI<sup>20</sup> = 4,5), dans un mélange BSA/ NP<sup>+</sup> 2/1 (poids/ poids) (cf : annexe -1-). L'analyse de taille de ce mélange présente une population monodisperse et le potentiel zêta est identique à celui des NP<sup>+</sup>. Les NP<sup>+</sup> peuvent également piéger 70% de dipalmitoylphosphatidyl glycerol (DPPG) en poids/ poids, sans changement de sa charge de surface [180, 181]. Toutefois, cette association nécessite des conditions de préparation particulières. Le DPPG est une molécule hydrophobe qui n'est soluble que dans des solvants organiques : chloroforme, éthanol,... Aussi, le DPPG est solubilisé au préalable dans de l'éthanol à 80°C (T°C > 45°C, T°C de transition de phase du DPPG) avant d'être injecté dans une solution de NP<sup>+</sup> également portée à 80°C. Nous avons pu remarquer qu'à l'instant de l'ajout de la phase organique dans la phase aqueuse, nous observons un trouble probablement dû à l'insolubilité du phospholipide dans l'eau. Après 10 min d'agitation du mélange à 80°C, la solution s'éclaircit pour devenir limpide. Lors de l'analyse de taille et de charge de cette préparation, nous retrouvons les caractéristiques des NP<sup>+</sup>. Ce chargement en DPPG des NP<sup>+</sup>, alors appelé NPL70 (quand le rapport en poids/ poids DPPG/ NP<sup>+</sup> est de 70%), change néanmoins, ses propriétés de formulation. En effet, dans un mélange BSA/ NPL70 avec BSA/ NP<sup>+</sup> 2/1 (poids/ poids), le potentiel zêta des particules est fortement diminué [180]. Les molécules de DPPG ayant occupé une partie de l'espace interne des NP<sup>+</sup>, la BSA ne s'associe pas seulement dans cette espace interne restant, mais déborde en surface, induisant une annulation des charges de surface cationiques des NP<sup>+</sup>.

L'utilisation à chaud d'éthanol, lors du chargement des NP<sup>+</sup> en DPPG, peut représenter une étape délicate lors de sa transposition à l'échelle industrielle. En effet, l'éthanol est un liquide hautement inflammable (catégorie B2) qui nécessite des dispositifs particuliers, pour son utilisation à chaud, en toute sécurité. Lors de l'étude de sa substitution, nous avons testé

---

<sup>20</sup> Point isoélectrique : pH auquel une molécule est sous une forme zwitterionique, non chargée

différents solvants industriels. Il en est ressorti que l'utilisation à 80°C de solutol HS 15 (Sol®) comme solvant du DPPG, permet de préparer des NPL70 à une concentration finale en Sol® de 2 mg/ml (cf : annexe -2-). D'après la littérature, le Sol® à usage intraveineux est toléré à des concentrations raisonnables mais son profil pharmacocinétique manque de données [182]. Des études ont montré que l'utilisation de surfactant non ionique, modifie l'activité des protéines d'efflux (ex : P-gp, MDR), pouvant améliorer l'index thérapeutique d'un médicament [183-185].

## II. Formulation du DMZ dans des NP

### II.1. Protocoles de séparation et d'analyse du DMZ-NP

Les taux d'association du DMZ b aux NP ont été déterminés suite au dosage du DMZ associé aux NP (DMZ-NP) et du DMZ total contenu dans la formulation. Le DMZ libre (281,3 Da) est séparé du DMZ-NP (~ 4 000 kDa) par filtration sur nanosep 30 kDa. Cette méthode et les résultats qu'elle a permis de produire, ont été vérifiés suite à une filtration sur gel de ces mêmes formulations. Cette technique, encore appelée chromatographie d'exclusion, permet de recueillir la fraction de DMZ-NP, séparément de celle du DMZ libre dont la sortie de colonne est retardée par les billes de séphadex. L'efficacité de cette méthode se vérifie par le calcul du rendement du DMZ sorti de la colonne (quantité de molécule déposée/ quantité de molécule recueillie). Cette technique nous a également permis de vérifier l'intégrité chimique de la fraction de DMZ libre par rapport au DMZ-NPL70.

Les dosages de DMZ ont été effectués par une méthode HPLC qui permet d'obtenir des dosages précis (seuil de détection : 0,01 µg/ml et seuil de dosage 0,5 µg/ml), mais également, d'étudier les réactions de dégradation du DMZ [186]. En solution, le DMZ fait l'objet de réactions d'hydrolyse qui scinde la molécule en deux : *p*-aminobenzamidine et *p*-hydroxybenzamidine; et d'oxydation qui transforme une ou les deux fonctions amidines du DMZ en groupement amide : DMZmonox et DMZdiox [107, 186]. Dans la composition du DMZ mis sur le marché, de l'antipyrine est d'ailleurs ajoutée pour ralentir cette réaction d'oxydation (Berenil®, Trypan®, Neozidin®), en plus de son rôle analgésique local.

## II.2. Facteurs limitant la formulation DMZ-NPL70

### II.2.1. Le DPPG

Nous avons étudié l'influence de la quantité de DPPG complexé aux NP<sup>+</sup> (NP<sup>+</sup> ou NPL<sub>0</sub>, NPL<sub>20</sub><sup>21</sup>, NPL<sub>50</sub><sup>\*</sup> et NPL<sub>70</sub><sup>\*</sup>), sur la capacité de chargement de ces structures colloïdales, en DMZ [187]. Pour une concentration donnée en DMZ et en NP<sup>+</sup>, le taux d'association DMZ-NPL est fonction du pourcentage de chargement en DPPG des NP<sup>+</sup>. Les NPL<sub>0</sub> ne présentent pas de DMZ-NPL<sub>0</sub>. Par contre les NPL<sub>20</sub>, NPL<sub>50</sub> et NPL<sub>70</sub> présentent des taux d'association en DMZ croissants [187].

A un rapport DMZ/ DPPG poids/ poids constant, le taux d'association du DMZ n'est pas fonction de la concentration en NP<sup>+</sup> (étude réalisée sur des lots de formulation à base de NPL<sub>50</sub> et NP<sub>70</sub>). C'est pourquoi, nous pouvons établir que l'association du DMZ aux NPL<sub>x</sub> est principalement dépendante de la quantité de DPPG contenu dans ces nanosytèmes. Plus le rapport DMZ/ DPPG poids/ poids est bas (< 2,3 %), plus le taux d'association du DMZ aux NPL<sub>x</sub> se rapproche de 100%.

Le mécanisme de chargement des NP<sup>+</sup> en DMZ se distingue de celui de la formulation d'amphotéricine B (AmB : 924,1 Da) développée par Loiseau P. et *al.*, [179]. Ils remarquent que comme l'AmB est une molécule anionique à caractère hydrophobe, au même titre que les molécules de DPPG (721,7 Da), la concentration en NP<sup>+</sup> est un facteur clef dans cette formulation. Le DPPG n'est alors qu'un facteur « déclencheur » de la diffusion des molécules d'AmB dans les NP<sup>+</sup>. Ils parviennent à associer 1 mg de cet antibiotique (**1,1 x 10<sup>-6</sup> M**) dans **5 mg de NP<sup>+</sup>** contenant 20% (**1,39 x 10<sup>-6</sup> M**) ou 50% (**4,80 x 10<sup>-6</sup> M**) de DPPG/ NP<sup>+</sup> poids/ poids.

Lors de l'étude du chargement en DMZ des NP<sup>+</sup>, quand le rapport DMZ/ DPPG poids/ poids est supérieur à 5%, la formulation nanoparticulaire n'est pas stable [187]. En effet, un précipité blanc est rapidement visible (dès 24h) au fond du tube. Nous estimons que l'ajout de 5% de DMZ dans une suspension de NPL<sub>70</sub>, induit une désorganisation des molécules de DPPG situées dans la matrice des NP<sup>+</sup>. Cette désorganisation provoquerait la sortie du DPPG du réseau interne des NP<sup>+</sup>, favorisant une précipitation du DPPG seul ou encore associé aux NP<sup>+</sup>, par insolubilité dans l'eau.

Ces formulations ont été réalisées dans de l'eau désionisée afin d'éviter la répulsion électrostatique des NPL<sub>x</sub> vis-à-vis des molécules de DMZ b qui, en présence de protons, portent des charges cationiques. Ce concept avait été vérifié lors d'une étude de l'association

---

<sup>21</sup> et\* : correspond aux NPL, anciennement appelé Ionic Amphiphilic Biovector (IAB) (Loiseau et *al.*)

de NP<sup>+</sup> ou de NPL70 avec des protéines globulaires à caractéristiques physicochimiques différentes, par une technique de résonance plasmonique de surface<sup>22</sup> (travaux réalisés en Master 1). Les protéines cationiques (pI > 7, ex : lysozyme) ne présentent aucune affinité pour les NP<sup>+</sup>, ni pour les NPL70.

La nécessité de la présence de DPPG dans la structure des NP<sup>+</sup>, met en avant que les interactions mises en jeu, lors du chargement des NPL<sub>x</sub> en DMZ, sont principalement des interactions hydrophobes (groupements benzène du DMZ/ phospholipide). Le même constat a été établi par Paul M. et *al.*, [188] lors de l'étude d'une formulation de la PTM avec des NP de Poly lactate (PLA). Le taux de chargement en PTM des NP de PLA était principalement dépendant de la quantité de phospholipide ajouté dans la composition des NP.

### II.2.2. Le procédé

Nous avons comparé l'efficacité d'une formulation colloïdale de DMZ-NPL70 réalisée *in process*<sup>23</sup> et en *post-loading*<sup>24</sup>. Les conditions du procédé *in process* induit une dégradation du DMZ b non négligeable, aussi notre choix s'est porté sur la méthode *post-loading* qui s'effectue à T°C ambiante. Cette dégradation a été caractérisée comme étant une oxydation du DMZ [186]. Elle est favorisée dans les milieux mixtes : alcool/ eau. Aussi, nous avons été amenés à chercher un solvant qui solubilise le DMZ b à une concentration élevée et à T°C ambiante. Nous avons choisi le propylène glycol qui solubilise le DMZ à plus de 100 g/l et n'interagit pas avec la molécule de DMZ b (absence de produits de dégradation).

Enfin, nous avons étudié l'influence de solvant résiduel (éthanol) sur le taux d'association du DMZ dans une formulation DMZ-NPL70 avec 2% DMZ/ DPPG en poids/ poids. En présence de 10% d'éthanol dans une solution de NPL70, le taux d'association du DMZ baisse de 97% à 72%. Cette réduction du taux d'association est accentuée lorsque nous augmentons la quantité d'éthanol dans la solution. Ainsi, la présence d'éthanol augmente l'affinité du DMZ b pour le milieu extérieur à la NP, limitant son association aux NPL70.

---

<sup>22</sup> Biacore®

<sup>23</sup> Les poudres DMZ b et DPPG sont solubilisées ensemble dans de l'éthanol absolu, puis, le mélange est ajouté aux NP<sup>+</sup>, le tout à 80°C

<sup>24</sup> La poudre de DMZ b est solubilisée dans de l'éthanol absolu, puis, ajouté dans une solution de NPL70, le tout à T°C ambiante

### **II.3. Protection du DMZ b des réactions de dégradation**

La formulation DMZ-NPL70 présente un taux d'association stable et offre l'avantage, par rapport à la forme de DMZ sur le marché, de protéger le DMZ de sa dégradation durant un stockage de 6 mois à 4°C. En effet, le DMZ associé au NPL70 ne présente ni de produit d'hydrolyse, ni de produit d'oxydation, laissant envisager que les molécules s'inséreraient dans le cœur lipidique des NP, limitant son contact avec les molécules d'eau du milieu. Par contre, le DMZ b libre dans la formulation, présente une réaction d'oxydation progressive dans le temps.

### **II.4. Le chargement maximal en DMZ des NPL70**

La meilleure formulation DMZ-NPL70 que nous ayant pu réaliser, est composée de **NP<sup>+</sup> : 5 mg/ml ; DPPG : 3,5 mg/ml ; propylène glycol : 2,1 µg/ml** et **DMZ : 0,14 mg/ml** dont 0,11 mg associé à la structure colloïdale (82%). Ainsi, **0,41 x 10<sup>-6</sup> M de DMZ** s'est associé à **4,85 x 10<sup>-6</sup> M de DPPG**, soit pour l'association d'une mole de DMZ, il faut au moins 11,8 moles de DPPG. Rappelons que quand il n'y a que 7,8 mole de DPPG pour 1 mole de DMZ, nous obtenons la formation d'un dépôt dans la solution DMZ-NPL70.

La quantité de principe actif associé aux NPL70 est insuffisante car le DMZ est efficace à des doses > 3 mg/kg. En effet, notre formulation DMZ-NPL70 ne contient que 0,14 g/l de DMZ total. Or, pour traiter des bovins (~600 kg) avec du DMZ à 3,5 mg/kg, il faut 2,1 g de DMZ, soit 150 l de cette formulation si son index thérapeutique est identique au DMZ diac. Des tests d'augmentation de la concentration en NP<sup>+</sup> ont été entrepris sans succès.

## **III. Efficacité thérapeutique de la formulation DMZ-NPL70**

Le principal site d'action du DMZ est l'ADN kinétoplastique du trypanosome auquel il se lie pour inhiber sa réplication et sa transcription. Cette action nécessite dans un premier temps, la pénétration du DMZ dans le corps du parasite et, dans un second temps, un adressage intra-mitochondrial. D'après la littérature, l'internalisation du DMZ dans le trypanosome s'effectue à l'aide d'un transport actif *via* TbAT1 (Fig. n°14) [108], et son adressage intra-cellulaire, par un adressage passif.

L'amélioration de l'index thérapeutique du DMZ, à l'aide d'une formulation colloïdale, sera d'autant plus importante que sa nouvelle forme galénique améliorera sa biodisponibilité sanguine, lymphatique et cérébrale.

La cinétique de libération de la formulation DMZ-NPL70 réalisée dans des conditions physiologiques (pH = 7,4, T°C = 37°C), met en évidence un « *burst effect* » représentant une libération de 20% du DMZ, suivi d'un taux d'association de DMZ stable pendant au moins 24h [187]. L'effet « *burst* » pourrait être favorisé par la désorption du DMZ en surface des NP<sup>+</sup>. Nous pouvons envisager que l'administration parentérale d'une formulation DMZ-NPL70 améliorerait la distribution du DMZ grâce à son acheminement par le vecteur.

Le DMZ-NPL70 et le DMZ diac ont une efficacité trypanocide dose-dépendante sur des *T.b.* mis en culture. De meilleurs résultats sont, toutefois obtenus pour la formulation colloïdale. Le contrôle correspondant au NPL70 dépourvues de principe actif, présente une légère action trypanocide. Cette faible toxicité s'expliquerait par l'affinité naturelle de ces NP chargées positivement vis-à-vis des trypanosomes qui présentent une charge de surface négative. Cette caractéristique connue des Trypanomastidae fait d'ailleurs l'objet de développement de vecteurs lipidiques cationiques à effet antiparasitaire [32, 189-192]. Nous pouvons expliquer par la même occasion la meilleure efficacité de nos formulations.

Néanmoins, les tests *in vivo* entrepris sur un modèle murin aigu de TA à *T.b.*, ne montrent pas de différence de dose efficace du DMZ qu'il soit sous forme associé à un vecteur ou libre. La taille (90±10 nm) de nos vecteurs peut expliquer la faible efficacité *in vivo* de notre formulation nanoparticulaire. La taille serait trop importante, empêchant une bonne diffusion de nos nanoparticules trypanocides dans les tissus sanguins et lymphatiques. En effet, par la voie intrapéritonéale le passage de macromolécules > 15 nm est sélectif [193]. Les cellules mésothéliales établissent des jonctions serrées et adhérentes qui représentent une barrière au passage transépithélial. Il existerait toutefois, des systèmes de contrôle à l'expression des protéines de jonctions (ZO-1, cadhérine, β-caténine, occludine et claudine) [194, 195]. La couche sous-mésothéliale comprend des capillaires sanguins et lymphatiques, et du tissu de soutien. Nous pouvons imaginer alors que le DMZ diac a pu diffuser en grande quantité dans la voie systémique et que le DMZ-NPL70 a pu rester bloquer en partie dans le site d'injection. Nous pensons que des formulations de taille < 50 nm auraient potentiellement été plus efficace.

#### **IV. Perspectives : Le franchissement des barrières biologiques**

La mise au point de vecteurs nanoparticulaires capables d'atteindre leur cible depuis leur site d'administration est extrêmement complexe, car leurs propriétés doivent leur permettre de s'affranchir de multiples interactions et perturbations physico-chimiques et biologiques. En effet, l'atout majeur d'un vecteur thérapeutique est l'amélioration de la biodistribution du

médicament associé. Aussi, pour notre formulation trypanocide, les tissus ciblés sont le sang, la lymphe et le liquide céphalo-rachidien où le parasite évolue.

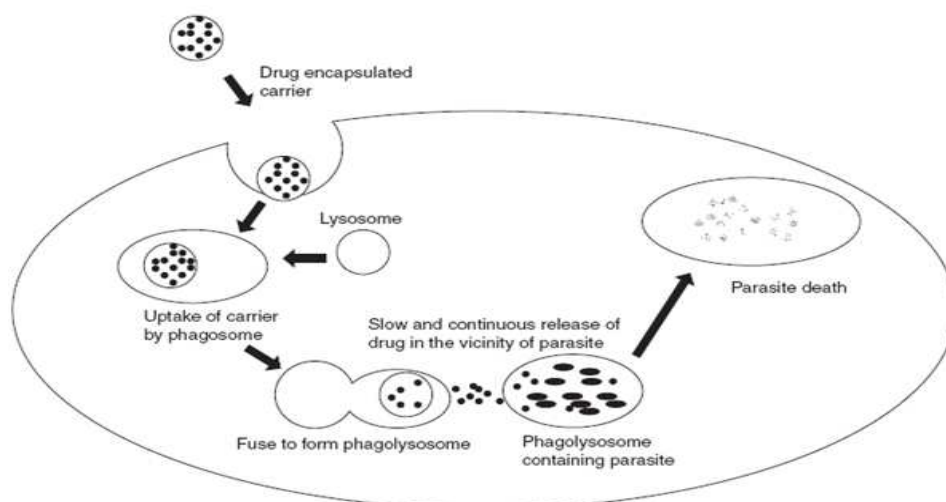
Paillard A. et *al.*, [180] et Jallouli Y. et *al.*, [181] ont étudié le potentiel d'activation des protéines du complément et de franchissement de la BHE par les NP<sup>+</sup> et les NPL70. Ils ont pu montrer *in vitro* la faisabilité de ces vecteurs thérapeutiques à s'affranchir de ces barrières biologiques.

#### **IV.1. La barrière sanguine**

L'administration parentérale de particules médicamenteuses est confrontée à l'activation du système réticuloendothélial, SRE, encore dénommé le système des phagocytes mononucléaires. Il correspond à l'ensemble des cellules phagocytaires dont on distingue : les phagocytes, issus des monocytes (macrophages résidents des tissus conjonctifs, de la rate, des ganglions lymphatiques, des alvéoles pulmonaires et du foie) et les cellules de soutien, à activité phagocytaire très faible. Le SRE possède diverses fonctions dont la fabrication des éléments du sang (protéines du complément) et la destruction des corps étrangers.

Des éléments exogènes présents dans un organisme supérieur, font l'objet d'une neutralisation par les cellules phagocytaires activées par le système du complément [196]. Cette ligne de défense peut être employée dans le domaine pharmaceutique afin de favoriser un ciblage passif des cellules ou des organes du SRE (Fig. 15).

Par exemple, dans la Leishmaniose Viscérale, le développement des parasites s'effectue dans le phagolysosome de macrophages circulants. Les agents pathogènes sont alors, concentrés en particulier dans le foie, la rate et la moelle osseuse. L'utilisation de formulations liposomales (Fig. 15) présente une amélioration de l'index thérapeutique des molécules antiparasitaires suite à une distribution en parfaite correspondance avec la localisation du parasite [189, 197-199],[200].



**Fig. 15 : Représentation du ciblage passif d'un macrophage lors du traitement de la Leishmaniose Viscérale à l'aide d'un vecteur de type lysosome [201]**

Cet adressage passif des particules médicamenteuses administrées par voie parentérale, est favorisé par une charge de surface importante. Dans la TA, les parasites sont exclusivement extracellulaires. C'est pourquoi l'application de SDM trypanocides doit éviter le SRE qui ne correspond pas exactement à la dissémination des trypanosomes africains dans le corps du malade. La stratégie la plus courante, de déviation du SRE, est l'utilisation d'une couronne stérique en surface des NP. Elle se compose de molécules amphiphiles qui inhibent l'activation du complément (ex : poly éthylène glycol (PEG)). Cette barrière stérique parvient à modifier le temps de demi-vie plasmatique des particules thérapeutiques. En effet, cette interface à caractère hydrophobe freine l'adsorption de protéines du complément en recouvrant les charges de surface de la NP, elles sont dites furtives [202-204].

Paillard A. et *al.*, [180] ont mis en évidence que l'insertion de phospholipides ou de BSA dans les NP<sup>+</sup> diminue leur reconnaissance par le SRE et améliore leur temps de résidence plasmatique. Pourtant, les NP<sup>+</sup> sont de forts activateurs du système du complément. Il en est de même pour les NP de poly(méthyl méthacrylate) qui présente une demi-vie de circulation sanguine de 3 min [205]. Cette activation est favorisée d'une part, par leur charge positive [203, 206] et d'autre part, par la présentation de fonctions hydroxyles libres [207, 208]. Toutefois, l'ajout d'au moins 30% de DPPG dans la structure des NP<sup>+</sup>, inhibe l'activation du complément. Le même phénomène est observé suite à l'ajout de BSA dans des NP<sup>+</sup>. Ces résultats ont mis en évidence que l'association de molécules anioniques dans les NP<sup>+</sup>, bien qu'elle ne modifie pas la taille des particules, modifie leur capacité à activer les protéines du complément, tel les couronnes de PEG. Ces résultats nous montrent que les NPL70 sont furtives et pourraient donc



circuler suffisamment longtemps après administration intrapéritonéale pour augmenter la biodisponibilité du DMZ.

#### **IV.2. La BHE**

Chez l'homme, les cellules endothéliales des capillaires cérébraux constitutifs de la BHE, présente une épaisseur de 0,3 à 0,5  $\mu\text{m}$  [209]. Cette barrière biologique représente l'obstacle majeur au développement de traitements de pathologies cérébrales [130]. En effet, la BHE se caractérise par sa fonction de restriction des échanges entre le sang et le parenchyme cérébral, permise grâce à une polarisation des cellules endothéliales cérébrales. En effet, ces cellules sont jointives, polarisées et ont une activité de pinocytose réduite. Du côté luminal, les récepteurs reconnaissent des macromolécules endogènes telles l'insuline, la Tf, IGF, la leptine et les LDL. Grâce à des transports vésiculaires, le complexe ligand/ récepteur est transporté vers le compartiment abluminal, il s'agit de la « transcytose médiée par récepteur » (TMR) [130, 210, 211]. Il existe également une voie non spécifique dénommée « transcytose médiée par adsorption » (TMA) qui nécessite une interaction électrostatique entre la partie cationique d'une macromolécule et des sites anioniques de la membrane luminale de la BHE [212, 213]. C'est d'ailleurs *via* cette voie que le virus du VIH à l'aide de la protéine Tat pénètre dans le parenchyme cérébral [214].

Une approche non invasive au traitement de pathologies cérébrales est le développement de vecteurs colloïdaux capables d'utiliser les voies de transports naturels de la BHE soit le TMA, soit le TMR (ex : à Tf, à insuline).

Jallouli Y. et *al.*, [181] ont travaillé sur l'étude de l'endocytose des NP<sup>+</sup> sur un modèle *in vitro* de la BHE. Les NP<sup>+</sup> s'associent à la membrane luminale des cellules endothéliales *via* des sites anioniques provenant probablement des protéoglycanes et des glycoprotéines qui recouvrent la face luminale [215, 216]. Elles semblent être internalisées *via* la voie de TMA empruntant la voie des clathrines dont le diamètre des vésicules est de 100 à 150 nm [217, 218]. Cette internalisation est toutefois orientée vers le compartiment lysosomal limitant la transcytose des NP<sup>+</sup>.

#### **IV.3. Ciblage intracellulaire du parasite**

La molécule trypanocide ne doit pas seulement être libérée dans le microenvironnement du trypanocide, elle devra encore interagir avec son site d'action intracellulaire. Les barrières biologiques entravant cet accès sont les membranes cellulaires, le triage intracellulaire et les systèmes d'élimination (ex : système d'efflux).

La première membrane cellulaire est la membrane plasmique qui présente une perméabilité sélective contrôlant les entrées et les sorties. Les médicaments trypanocides présentent des transporteurs actifs. Toutefois, il existe des souches résistantes à ces traitements par absence de transporteurs en surface. L'option à cette situation serait une entrée des molécules trypanocides par endocytose, formation de vésicules intracellulaires (Fig. 7). Toutefois, la destination de ces dernières peut être le transfert d'un compartiment à un autre (endosome, corps multivésiculaires) ou l'exocytose. Aussi, ce type de franchissement ne permet pas aux médicaments d'accéder directement au cytosol ou au noyau. Toutefois, rappelons que ce phénomène d'endocytose est régio-sélectif et probablement adapté pour effectuer de l'endocytose rapide et d'une manière non-spécifique chez le Trypanomastidae [19]. Les principes actifs pourraient donc rester associés à leur vecteur afin de franchir la membrane plasmique par endocytose. Cette activité se produit exclusivement au niveau de la poche flagellaire (PF) et correspond à la formation de vésicules à clathrine. Cette région membranaire se distingue du reste de la surface du parasite par son protéome (tableau 1) [19]. Le R<sup>Tf</sup>, le récepteur haptoglobuline – hémoglobuline (HPHBR), le R<sup>LDL</sup> et le CRAM (cysteine-rich acidic integral membrane protein) sont des protéines exprimées dans la PF de la forme TSg. Suite à une activation ligand spécifique, ces protéines membranaires peuvent induire une endocytose [42, 44, 47].

Les NP que nous utilisons s'adsorbent aisément en surface des parasites [187]. Toutefois, la probabilité d'une endocytose passive est faible car la PF ne représente que 2,4% de la surface totale du parasite [19]. Ainsi, afin d'augmenter cette probabilité de pénétration *via* une endocytose, nous pourrions envisager d'ajouter en surface des NP un ligand au R<sup>Tf</sup>, R<sup>LDL</sup>, HPHBR ou CRAM. La preuve de concept de l'aptitude des NPL70 à adsorber en surface des protéines à d'ailleurs déjà été réalisé à travers les travaux de Paillard A. et *al.* [180] à l'aide de BSA.

Le vecteur internalisé doit encore permettre la libération du principe actif dans le cytosol et s'assurer à ce qu'il atteigne son site d'action sans être dégradé au préalable. Or, dans l'organisme des Trypanomastidae, les vésicules font l'objet d'adressage vers des compartiments de triage. D'après la littérature, l'endocytose de la Tf et des LDL ne présentent pas la même destination. Leur voie d'endocytose clathrine dépendante s'oriente vers l'endosome précoce. Cependant, la Tf et son récepteur sont recyclés [219] alors que les LDL et leur récepteur sont dissociés afin que le R<sup>LDL</sup> soit recyclé et que les LDL soient adressés aux lysosomes [220, 221]. Pour maîtriser ce trafic intracellulaire, il faut connaître les signaux d'adressage.

## V. Conclusion et perspectives

La formulation DMZ-NPL70 mise au point lors de notre étude, présente un taux d'association en principe actif stable jusqu'à 6 mois lors d'un stockage à 4°C. Cette formulation colloïdale présente également l'avantage de protéger le DMZ associé de réactions de dégradation. Son efficacité thérapeutique *in vitro* montre une légère amélioration par rapport au DMZ diac et les tests *in vivo* réalisés sur un modèle murin de TA aiguë montrent que la dose efficace de cette formulation est de 3 mg/kg.

La principale limite de cette formulation est son chargement en principe actif qui reste limité à 0,11 mg de DMZ pour 5 mg de NP<sup>+</sup>. D'après les études du chargement des NP<sup>+</sup> en médicaments à caractéristiques physicochimiques variées, le DMZ n'est pas un bon candidat pour notre nanosystème. Ses groupements amidines et son caractère hydrophobe lui confèrent un pouvoir déstructurant lorsqu'il est trop concentré dans la solution de NPL70 (seuil à 0,175 mg de DMZ pour 5 mg de NP<sup>+</sup>).

Nous pouvons toutefois envisager d'augmenter la dose efficace de notre formulation DMZ-NPL70 en diminuant la taille des NP<sup>+</sup>. Nous parviendrons potentiellement à augmenter la biodisponibilité du DMZ suite à une administration intrapéritonéale sur un modèle animal de TA chronique [17]. Nous testerons enfin l'utilité d'une fonctionnalisation des NPL70 à l'aide de Tf, ou de ligand LDL, voire contenant deux types de ligand ; Tf + haptoglobuline pour effectuer un double ciblage, BHE et trypanosome, en vue d'optimiser la biodistribution du DMZ formulé.

## CONCLUSION

---

## CONCLUSION GENERALE

---

La recherche de SDM trypanocides présente, à ce jour, un impact limité sur la lutte contre la TA. Toutefois, cette approche issue de l'ingénierie en galénique, présente l'avantage d'être moins couteuse et d'être plus efficace (rendement) que le développement de nouvelles molécules à propriétés trypanocides. Elle vise à améliorer la commodité de la prise de médicament.

La lutte contre les Trypanosomoses représente à l'heure d'aujourd'hui un véritable défi pour la communauté des chercheurs. L'amélioration des connaissances pour comprendre la physiopathologie est nécessaire. De nouveaux médicaments et protocoles de traitements sont urgents. Les industries pharmaceutiques doivent être encouragées dans ce sens.

*« L'histoire du médicament n'est pas et ne sera jamais finie tant les progrès qu'il reste à faire sont considérables, tant il nous reste des maladies à guérir, tant les agents infectieux s'adaptent, tant de nouvelles maladies apparaissent »*

Pierre Joly <sup>25</sup>

---

<sup>25</sup> Préface « *Histoire et médicament* »

# ANNEXES

---

**ANNEXE -1- Les NP polysaccharidiques à cœur huileux**

**Article 2: Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behaves as ‘stealth’ cationic nanocarriers**

*Ref.: A. Paillard et al., Pharmaceutical Research, 27 (1) : 126-33, Jan 2010*

## **ANNEXE -2- Protocole de préparation de NPL70 à l'aide de Solutol HS 15**

Le Sol<sup>®</sup> est un surfactant non-ionique qui se compose d'un mélange de 70% de mono-diester d'acide 12-hydroxystéarique (partie hydrophobe) et de 30% de poly éthylène glycol 660 (partie hydrophile). Il se caractérise par une CMC de 0,02 % (poids/ volume) à 25°C. A température ambiante, le Sol<sup>®</sup> est solide. Il est donc, préférable de le manipuler à 60°C où sa densité est de 1,03 g/ml<sup>26</sup>,

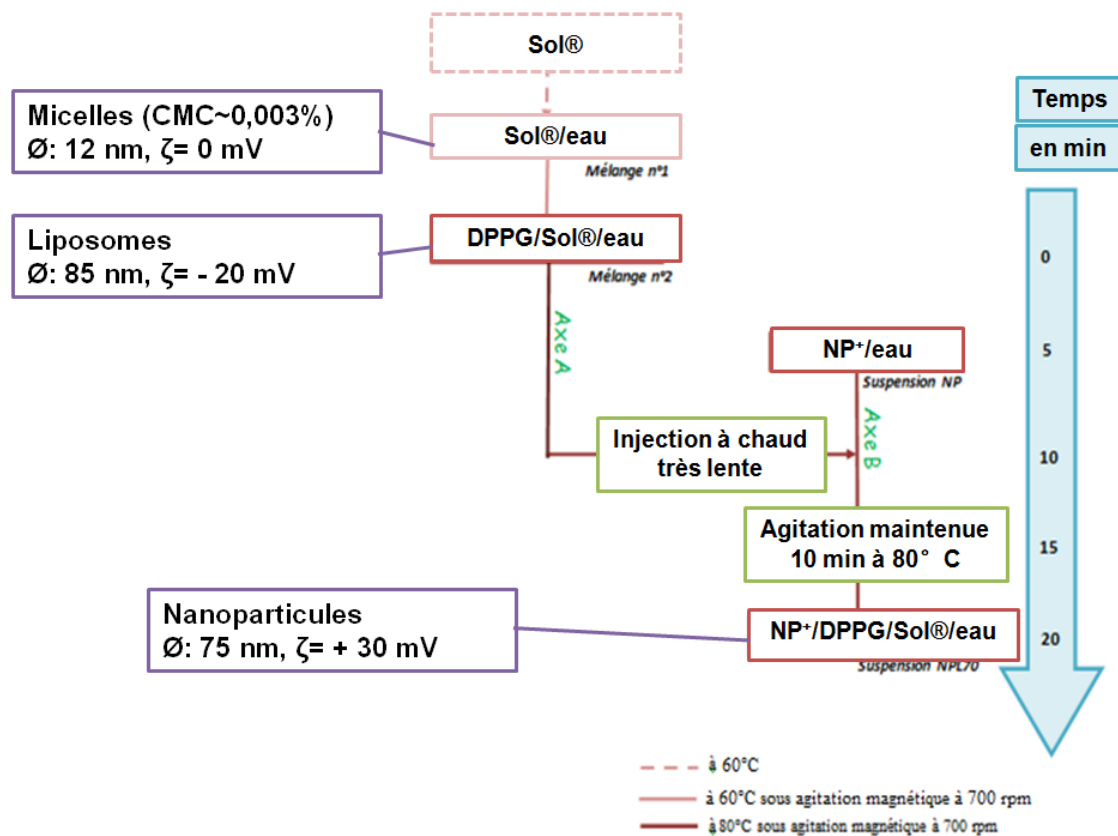
La préparation de NPL70 à l'aide de Sol<sup>®</sup>, s'articule en quatre points :

- Préparation, à 60°C, d'un mélange Sol<sup>®</sup>/ eau à 49,05 mg/ml en Sol<sup>®</sup>
- Micellisation du DPPG dans le mélange Sol<sup>®</sup>/ eau à 80°C, avec un rapport Sol<sup>®</sup>/ DPPG poids/ poids à 57,1% (micelle de diamètre : 15 nm et de potentiel zêta : - 10 mV, à 25°C)
- Injection à 80°C de ce mélange DPPG/ Sol<sup>®</sup>/ eau dans une suspension de NP<sup>+</sup> à 5 mg/ml
- Agitation magnétique maintenue à 80°C, le temps nécessaire à ce que le mélange devienne limpide, paramètre visible, de l'association complète DPPG/ NP<sup>+</sup>

---

<sup>26</sup> Donnée fourni par la société BASF





**Fig. : schéma de la préparation de NPL70 à l'aide de Solutol® HS 15**

Ces NPL70 Sol® présenteraient les mêmes caractéristiques physico-chimiques que les NPL70 issues d'une préparation à l'aide d'éthanol (taille, potentiel zêta, chargement en DMZ).

Toutefois, le Sol® représente une composante en plus, dans la composition finale des NPL70 : pour 100 ml, 50 mg de NP<sup>+</sup>, 35 mg de DPPG et 20 mg de Sol®. A la différence de l'éthanol qui est absent de la préparation finale (éthanol résiduel éliminé par dialyse).

### L'axe A.



### L'axe B.

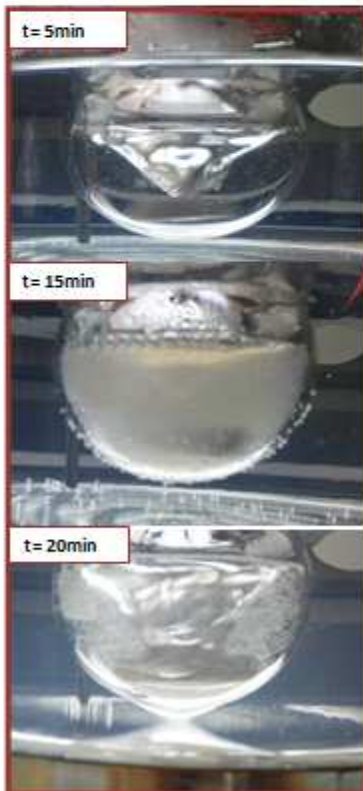


Fig. n°2 : Photos de la préparation de NPL70 illustrant les étapes correspondant à l'axe A et l'axe B de la fig.n°1 :

- Solubilisation du DPPG par micellisation dans un mélange Sol@/eau
- Injection à chaud du DPPG dans la suspension de NP

Ci-dessus, nous observons la présence de mousse de Sol@ en surface du mélange NP/DPPG/Sol@/eau.

Ci-dessous nous montrons que la suspension de NPL70 est légèrement opalescente.

### Suspension de NPL70 Sol@



# BIBLIOGRAPHIE

---

## **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 World Health Organization. (2004) Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, a estimates for 2002. The World Health Report, Annex Table 2
- 2 Gehrig, S. and Efferth, T. (2008) Development of drug resistance in *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei gambiense*. Treatment of human African trypanosomiasis with natural products (Review). *Int J Mol Med.* **22**, 411-419
- 3 Wolfe, N. D., Dunavan, C. P. and Diamond, J. (2007) Origins of major human infectious diseases. *Nature.* **447**, 279-283
- 4 Lloyd-Smith, J. O., George, D., Pepin, K. M., Pitzer, V. E., Pulliam, J. R., Dobson, A. P., Hudson, P. J. and Grenfell, B. T. (2009) Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science.* **326**, 1362-1367
- 5 Organisation Mondiale de la Santé. (1979) Les trypanosomoses africaines. Rapport de la réunion conjointe d'un comité d'experts de l'OMS et d'une consultation d'experts de la FAO, 1-120
- 6 Barrett, M. P., Burchmore, R. J., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J. and Krishna, S. (2003) The trypanosomoses. *Lancet.* **362**, 1469-1480
- 7 Couvreur, P., Tulkens, P., Roland, M., Trouet, A. and Speiser, P. (1977) Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier. *FEBS Lett.* **84**, 323-326
- 8 Kreuter, J. (1983) Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm Acta Helv.* **58**, 242-250
- 9 Kreuter, J., Nefzger, M., Liehl, E., Czok, R. and Voges, R. (1983) Distribution and elimination of poly(methyl methacrylate) nanoparticles after subcutaneous administration to rats. *J Pharm Sci.* **72**, 1146-1149
- 10 Chavany, C., Le Doan, T., Couvreur, P., Puisieux, F. and Helene, C. (1992) Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides. *Pharm Res.* **9**, 441-449
- 11 Pollock, J. N. (2005) Bulletin d'information sur les glossines et les trypanosomoses. PLTA: Programme de lutte contre la trypanosomose africaine **28**

- 12 Burchmore, R. J., Ogbunude, P. O., Enanga, B. and Barrett, M. P. (2002) Chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Curr Pharm Des.* **8**, 256-267
- 13 Delespaux, V. and de Koning, H. P. (2007) Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resist Updat.* **10**, 30-50
- 14 Etchegorry, M. G., Helenport, J. P., Pecoul, B., Jannin, J. and Legros, D. (2001) Availability and affordability of treatment for Human African Trypanosomiasis. *Trop Med Int Health.* **6**, 957-959
- 15 Jannin, J., Louis, F. J., Lucas, P. and Simarro, P. P. (2001) [Control of human African trypanosomiasis: back to square one]. *Med Trop (Mars).* **61**, 437-440
- 16 Jennings, F. W. (1993) Combination chemotherapy of CNS trypanosomiasis. *Acta Trop.* **54**, 205-213
- 17 Jennings, F. W. and Gray, G. D. (1983) Relapsed parasitaemia following chemotherapy of chronic *T. brucei* infections in mice and its relation to cerebral trypanosomes. *Contrib Microbiol Immunol.* **7**, 147-154
- 18 Legros, D., Ollivier, G., Gastellu-Etchegorry, M., Paquet, C., Burri, C., Jannin, J. and Buscher, P. (2002) Treatment of human African trypanosomiasis--present situation and needs for research and development. *Lancet Infect Dis.* **2**, 437-440
- 19 Field, M. C. and Carrington, M. (2009) The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol.* **7**, 775-786
- 20 Majiwa, P. A., Maina, M., Waitumbi, J. N., Mihok, S. and Zweygarth, E. (1993) *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology.* **106** ( Pt 2), 151-162
- 21 Majiwa, P. A., Masake, R. A., Nantulya, V. M., Hamers, R. and Matthyssens, G. (1985) *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense*: identification of two karyotypic groups. *EMBO J.* **4**, 3307-3313
- 22 Gardiner, P. R. and Wilson, A. J. (1987) *Trypanosoma* (*Duttonefla*) *vivax*. *Parasitol Today.* **3**, 49-52
- 23 Euzéby, J. (1986) *Protozoologie Médicale Comparée*. Collection Fondation Marcel Mérieux. **1**, 1-463

- 24 Moulton, J. E. and Sollod, A. E. (1976) Clinical, serologic, and pathologic changes in calves with experimentally induced *Trypanosoma brucei* infection. *Am J Vet Res.* **37**, 791-802
- 25 Welde, B. T., Reardon, M. J., Kovatch, R. M., Chumo, D. A., Williams, J. S., Boyce, W. L., Hockmeyer, W. T. and Wykoff, D. E. (1989) Experimental infection of cattle with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Ann Trop Med Parasitol.* **83 Suppl 1**, 133-150
- 26 Vickerman, K. (1962) The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: an hypothesis based on ultrastructural observations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **56**, 487-495
- 27 Hawking, F. (1973) The differentiation of *Trypanosoma rhodesiense* from *T. brucei* by means of human serum. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **67**, 517-527
- 28 Shiflett, A. M., Faulkner, S. D., Cotlin, L. F., Widener, J., Stephens, N. and Hajduk, S. L. (2007) African trypanosomes: intracellular trafficking of host defense molecules. *J Eukaryot Microbiol.* **54**, 18-21
- 29 Hager, K. M. and Hajduk, S. L. (1997) Mechanism of resistance of African trypanosomes to cytotoxic human HDL. *Nature.* **385**, 823-826
- 30 Bringaud, F. (2005) Les Trypanomastides sous les feux du séquençage/ Comparative genomics of Trypanomastide parasitic Protozoa *Erudit.* **21**, 1027-1028
- 31 Vickerman, K. (1969) The fine structure of *Trypanosoma congolense* in its bloodstream phase. *J Protozool.* **16**, 54-69
- 32 Souto-Padron, T., de Carvalho, T. U., Chiari, E. and de Souza, W. (1984) Further studies on the cell surface charge of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **41**, 215-225
- 33 Schneider, A., Eichenberger, W. and Seebeck, T. (1988) A microtubule-binding protein of *Trypanosoma brucei* which contains covalently bound fatty acid. *J Biol Chem.* **263**, 6472-6475
- 34 Cross, G. A. (1975) Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology.* **71**, 393-417

- 35 Davitz, M. A., Gurnett, A. M., Low, M. G., Turner, M. J. and Nussenzweig, V. (1987) Decay-accelerating factor (DAF) shares a common carbohydrate determinant with the variant surface glycoprotein (VSG) of the African *Trypanosoma brucei*. *J Immunol.* **138**, 520-523
- 36 Davitz, M. A. (1987) Decay-accelerating factor (DAF): a review of its function and structure. *Acta Med Scand Suppl.* **715**, 111-121
- 37 Vincendeau, P. and Bouteille, B. (2006) Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *An Acad Bras Cienc.* **78**, 645-665
- 38 Urwyler, S., Studer, E., Renggli, C. K. and Roditi, I. (2007) A family of stage-specific alanine-rich proteins on the surface of epimastigote forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* **63**, 218-228
- 39 Absalon, S., Kohl, L., Branche, C., Blisnick, T., Toutirais, G., Rusconi, F., Cosson, J., Bonhivers, M., Robinson, D. and Bastin, P. (2007) Basal body positioning is controlled by flagellum formation in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One.* **2**, e437
- 40 Ziegelbauer, K. and Overath, P. (1993) Organization of two invariant surface glycoproteins in the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun.* **61**, 4540-4545
- 41 Taylor, A. E. and Godfrey, D. G. (1969) A new organelle of bloodstream salivarian trypanosomes. *J Protozool.* **16**, 466-470
- 42 Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D. P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Jacquet, A., Moguilevsky, N., Dieu, M., Kane, J. P., De Baetselier, P., Brasseur, R. and Pays, E. (2003) Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature.* **422**, 83-87
- 43 Kabiri, M. and Steverding, D. (2000) Studies on the recycling of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei* using an inducible gene expression system. *Eur J Biochem.* **267**, 3309-3314
- 44 Steverding, D., Stierhof, Y. D., Fuchs, H., Tauber, R. and Overath, P. (1995) Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol.* **131**, 1173-1182
- 45 Mussmann, R., Engstler, M., Gerrits, H., Kieft, R., Toaldo, C. B., Onderwater, J., Koerten, H., van Luenen, H. G. and Borst, P. (2004) Factors affecting the level and localization of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* **279**, 40690-40698

- 46 Pal, A., Hall, B. S., Nesbeth, D. N., Field, H. I. and Field, M. C. (2002) Differential endocytic functions of *Trypanosoma brucei* Rab5 isoforms reveal a glycosylphosphatidylinositol-specific endosomal pathway. *J Biol Chem.* **277**, 9529-9539
- 47 Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M. J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S. K. and Pays, E. (2008) A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science.* **320**, 677-681
- 48 Qiao, X., Chuang, B. F., Jin, Y., Muranjan, M., Hung, C. H., Lee, P. T. and Lee, M. G. S. (2006) Sorting Signals Required for Trafficking of the Cysteine-Rich Acidic Repetitive Transmembrane Protein in *Trypanosoma brucei* Eukariotic cell. **5**, 1229-1242
- 49 Allen, C. L., Liao, D., Chung, W. L. and Field, M. C. (2007) Dileucine signal-dependent and AP-1-independent targeting of a lysosomal glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **156**, 175-190
- 50 Lai, D. H., Hashimi, H., Lun, Z. R., Ayala, F. J. and Lukes, J. (2008) Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 1999-2004
- 51 Gabernet-Castello, C., Dacks, J. B. and Field, M. C. (2009) The single ENTH-domain protein of trypanosomes; endocytic functions and evolutionary relationship with epsin. *Traffic.* **10**, 894-911
- 52 Vickerman, K. (1969) On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J Cell Sci.* **5**, 163-193
- 53 Ortiz, D., Sanchez, M. A., Quecke, P. and Landfear, S. M. (2009) Two novel nucleobase/pentamidine transporters from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **163**, 67-76
- 54 Cachon, M. and Cosson, M. P. (1988) Ciliary and flagellar apparatuses and their associated structures. *Biol Cell.* **63**, 115
- 55 Gull, K. (1999) The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol.* **53**, 629-655



- 56 Allen, C. L., Goulding, D. and Field, M. C. (2003) Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **22**, 4991-5002
- 57 Hung, C. H., Qiao, X., Lee, P. T. and Lee, M. G. (2004) Clathrin-dependent targeting of receptors to the flagellar pocket of procyclic-form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell.* **3**, 1004-1014
- 58 Morgan, G. W., Goulding, D. and Field, M. C. (2004) The single dynamin-like protein of *Trypanosoma brucei* regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis. *J Biol Chem.* **279**, 10692-10701
- 59 Michels, P. A., Hannaert, V. and Bringaud, F. (2000) Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol Today.* **16**, 482-489
- 60 Vickerman, K. (1965) Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature.* **208**, 762-766
- 61 Schoenbach, E. B. and Greenspan, E. M. (1948) The pharmacology, mode of action and therapeutic potentialities of stilbamidine, pentamidine, propamidine and other aromatic diamidines a review. *Medicine (Baltimore).* **27**, 327-377
- 62 Verlinde, C. L., Hannaert, V., Blonski, C., Willson, M., Perie, J. J., Fothergill-Gilmore, L. A., Opperdoes, F. R., Gelb, M. H., Hol, W. G. and Michels, P. A. (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat.* **4**, 50-65
- 63 Robinson, D. R. and Gull, K. (1991) Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature.* **352**, 731-733
- 64 Hajduk, S., Adler, B., Bertrand, K., Fearon, K., Hager, K., Hancock, K., Harris, M., Le Blanc, A., Moore, R., Pollard, V. and et al. (1992) Molecular biology of African trypanosomes: development of new strategies to combat an old disease. *Am J Med Sci.* **303**, 258-270
- 65 Myler, P. J. (1993) Molecular variation in trypanosomes. *Acta Trop.* **53**, 205-225
- 66 Myler, P. J., Glick, D., Feagin, J. E., Morales, T. H. and Stuart, K. D. (1993) Structural organization of the maxicircle variable region of *Trypanosoma brucei*: identification of potential replication origins and topoisomerase II binding sites. *Nucleic Acids Res.* **21**, 687-694

- 67 Gibson, W. C. and Borst, P. (1986) Size-fractionation of the small chromosomes of Trypanozoon and Nannomonas trypanosomes by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Mol Biochem Parasitol.* **18**, 127-140
- 68 Gibson, W. and Garside, L. (1991) Genetic exchange in *Trypanosoma brucei brucei*: variable chromosomal location of housekeeping genes in different trypanosome stocks. *Mol Biochem Parasitol.* **45**, 77-89
- 69 Motyka, S. A. and Englund, P. T. (2004) RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol.* **7**, 362-368
- 70 McGonigle, S., Dalton, J. P. and James, E. R. (1998) Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitol Today.* **14**, 139-145
- 71 Fairlamb, A. H. and Cerami, A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* **46**, 695-729
- 72 Hunter, W. N., Bailey, S., Habash, J., Harrop, S. J., Helliwell, J. R., Aboagye-Kwarteng, T., Smith, K. and Fairlamb, A. H. (1992) Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design. *J Mol Biol.* **227**, 322-333
- 73 Voorheis, H. P. (1980) Fatty acid uptake by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and other species of the kinetoplastida. *Mol Biochem Parasitol.* **1**, 177-186
- 74 Smith, T. K. and Butikofer, P. (2010) Lipid metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **172**, 66-79
- 75 Fenn, K. and Matthews, K. R. (2007) The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Curr Opin Microbiol.* **10**, 539-546
- 76 Natesan, S. K., Peacock, L., Matthews, K., Gibson, W. and Field, M. C. (2007) Activation of endocytosis as an adaptation to the mammalian host by trypanosomes. *Eukaryot Cell.* **6**, 2029-2037
- 77 Malvy, D., Djossou, F., Weill, F. X., Chapuis, P., Longy-Boursier, M. and Le Bras, M. (2001) Trypanosomose humaine africaine à *Trypanosoma brucei gambiense* avec chancres d'inoculation chez un français expatrié. *Medecine Tropicale.* **61**, 323-327
- 78 Apted, F. I. C. (1970) Clinical manifestations and diagnosis of sleeping sickness. In: *The African Trypanosomoses*, Mulligan, H.W. (editor), 661-683

- 79 Pentreath, V. W. (1995) Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting at Manson House, London, 19 May 1994. Trypanosomiasis and the nervous system. Pathology and immunology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **89**, 9-15
- 80 Vickerman, K. (1985) Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull.* **41**, 105-114
- 81 Grab, D. J. and Kennedy, P. G. (2008) Traversal of human and animal trypanosomes across the blood-brain barrier. *J Neurovirol.* **14**, 344-351
- 82 Nikolskaia, O. V., de, A. L. A. P., Kim, Y. V., Lonsdale-Eccles, J. D., Fukuma, T., Scharfstein, J. and Grab, D. J. (2006) Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J Clin Invest.* **116**, 2739-2747
- 83 Nikolskaia, O. V., Kim, Y. V., Kovbasnjuk, O., Kim, K. J. and Grab, D. J. (2006) Entry of *Trypanosoma brucei gambiense* into microvascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. *Int J Parasitol.* **36**, 513-519
- 84 Buguet, A., Bert, J., Tapie, P., Tabaraud, F., Doua, F., Lonsdorfer, J., Bogui, P. and Dumas, M. (1993) Sleep-wake cycle in human African trypanosomiasis. *J Clin Neurophysiol.* **10**, 190-196
- 85 Adams, J. H., Haller, L., Boa, F. Y., Doua, F., Dago, A. and Konian, K. (1986) Human African trypanosomiasis (*T.b. gambiense*): a study of 16 fatal cases of sleeping sickness with some observations on acute reactive arsenical encephalopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **12**, 81-94
- 86 Goodwin, L. G. (1970) The pathology of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **64**, 797-817
- 87 Ikede, B. O. and Losos, G. J. (1972) Hereditary transmission of *Trypanosoma vivax* in sheep. *Br Vet J.* **128**, i-ii
- 88 Holzmüller, P., Biron, D. G., Courtois, P., Koffi, M., Bras-Goncalves, R., Daulouede, S., Solano, P., Cuny, G., Vincendeau, P. and Jamonneau, V. (2008) Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes Infect.* **10**, 79-86

- 89 Bengaly, Z., Sidibe, I., Boly, H., Sawadogo, L. and Desquesnes, M. (2002) Comparative pathogenicity of three genetically distinct *Trypanosoma congolense*-types in inbred Balb/c mice. *Vet Parasitol.* **105**, 111-118
- 90 Bengaly, Z., Sidibe, I., Ganaba, R., Desquesnes, M., Boly, H. and Sawadogo, L. (2002) Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet Parasitol.* **108**, 1-19
- 91 Holzmuller, P., Grebaut, P., Peltier, J. B., Brizard, J. P., Perrone, T., Gonzatti, M., Bengaly, Z., Rossignol, M., Aso, P. M., Vincendeau, P., Cuny, G., Boulange, A. and Frutos, R. (2008) Secretome of animal trypanosomes. *Ann N Y Acad Sci.* **1149**, 337-342
- 92 Grebaut, P., Chuchana, P., Brizard, J. P., Demetree, E., Seveno, M., Bossard, G., Jouin, P., Vincendeau, P., Bengaly, Z., Boulange, A., Cuny, G. and Holzmuller, P. (2009) Identification of total and differentially expressed excreted-secreted proteins from *Trypanosoma congolense* strains exhibiting different virulence and pathogenicity. *Int J Parasitol.* **39**, 1137-1150
- 93 Nok, A. J. and Balogun, E. O. (2003) A bloodstream *Trypanosoma congolense* sialidase could be involved in anemia during experimental trypanosomiasis. *J Biochem.* **133**, 725-730
- 94 Bangs, J. D., Ransom, D. A., Nimick, M., Christie, G. and Hooper, N. M. (2001) In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. *Mol Biochem Parasitol.* **114**, 111-117
- 95 McKerrow, J. H., Engel, J. C. and Caffrey, C. R. (1999) Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem.* **7**, 639-644
- 96 Morty, R. E., Lonsdale-Eccles, J. D., Mentele, R., Auerswald, E. A. and Coetzer, T. H. (2001) Trypanosome-derived oligopeptidase B is released into the plasma of infected rodents, where it persists and retains full catalytic activity. *Infect Immun.* **69**, 2757-2761
- 97 Ferreira, V., Molina, M. C., Schwaeble, W., Lemus, D. and Ferreira, A. (2005) Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends Parasitol.* **21**, 169-174
- 98 Ferreira, V., Molina, M. C., Valck, C., Rojas, A., Aguilar, L., Ramirez, G., Schwaeble, W. and Ferreira, A. (2004) Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol.* **40**, 1279-1291

- 99 Collar, C. J., Al-Salabi, M. I., Stewart, M. L., Barrett, M. P., Wilson, W. D. and de Koning, H. P. (2009) Predictive computational models of substrate binding by a nucleoside transporter. *J Biol Chem.* **284**, 34028-34035
- 100 Durand, R., Paul, M., Rivollet, D., Fessi, H., Houin, R., Astier, A. and Deniau, M. (1997) Activity of pentamidine-loaded poly (D,L-lactide) nanoparticles against *Leishmania infantum* in a murine model. *Parasite.* **4**, 331-336
- 101 Durand, R., Paul, M., Rivollet, D., Houin, R., Astier, A. and Deniau, M. (1997) Activity of pentamidine-loaded methacrylate nanoparticles against *Leishmania infantum* in a mouse model. *Int J Parasitol.* **27**, 1361-1367
- 102 Geerts, S., Kageruka, P., De Deken, R., Brandt, J. R., Kazadi, J. M., Diarra, B., Eisler, M. C., Lemmouchi, Y., Schacht, E. and Holmes, P. H. (1997) Prophylactic effects of isometamidium- and ethidium-sustained release devices against *Trypanosoma congolense* in cattle. *Acta Trop.* **65**, 23-31
- 103 Olbrich, C., Gessner, A., Kayser, O. and Muller, R. H. (2002) Lipid-drug-conjugate (LDC) nanoparticles as novel carrier system for the hydrophilic antitrypanosomal drug diminazenediacetate. *J Drug Target.* **10**, 387-396
- 104 Karembe, H. (2008) Amélioration du contrôle et harmonisation des normes internationales de qualité des trypanocides. Conférence de l'OIE sur les médicaments vétérinaires en Afrique, Dakar. **Session 4**, 1-6
- 105 Williamson, J. (1970) Nucleoside trypanocides and *Trypanosoma congolense*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **64**, 179
- 106 Jensch, H. (1955) [4, 4'-Diamidino-diazoaminobenzene, a new agent in the treatment of trypanosomiasis and babesiasis.]. *Arzneimittelforschung.* **5**, 634-635
- 107 Campbell, M., Pranker, R. J., Davie, A. S. and Charman, W. N. (2004) Degradation of berenil (diminazene aceturate) in acidic aqueous solution. *J Pharm Pharmacol.* **56**, 1327-1332
- 108 de Koning, H. P., Anderson, L. F., Stewart, M., Burchmore, R. J., Wallace, L. J. and Barrett, M. P. (2004) The trypanocide diminazene aceturate is accumulated predominantly through the TbAT1 purine transporter: additional insights on diamidine resistance in african trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**, 1515-1519

- 109 Homeida, A. M., El Amin, E. A., Adam, S. E. and Mahmoud, M. M. (1981) Toxicity of diminazene aceturate (Berenil) to camels. *J Comp Pathol.* **91**, 355-360
- 110 Leach, T. M. (1961) Observations on the treatment of *Trypanosoma evansi* infection in camels. *J Comp Pathol.* **71**, 109-117
- 111 Bouteille, B., Oukem, O., Bisser, S. and Dumas, M. (2003) Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundam Clin Pharmacol.* **17**, 171-181
- 112 Shapiro, T. A. and Englund, P. T. (1990) Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 950-954
- 113 Wragg, W. R., Washbourn, K., Brown, K. N. and Hill, J. (1958) Metamidium: a new trypanocidal drug. *Nature.* **182**, 1005-1006
- 114 Leach, T. M., Karib, A. A., Ford, E. J. and Wilmshurst, E. C. (1955) Studies on ethidium bromide. VI. The prophylactic properties of the drug. *J Comp Pathol.* **65**, 130-142
- 115 Dolan, R. B., Okech, G., Alushula, H., Mutugi, M., Stevenson, P., Sayer, P. D. and Njogu, A. R. (1990) Homidium bromide as a chemoprophylactic for cattle trypanosomiasis in Kenya. *Acta Trop.* **47**, 137-144
- 116 Richardson, J. P. (1973) Mechanism of ethidium bromide inhibition of RNA polymerase. *J Mol Biol.* **78**, 703-714
- 117 Marcus, S. L., Kopelman, R., Koll, B. and Bacchi, C. J. (1982) Effects of exogenous polyamine and trypanocides on the DNA polymerase activities from *Trypanosoma brucei brucei*, mouse thymus and murine leukemia virus. *Mol Biochem Parasitol.* **5**, 231-243
- 118 Casero, R. A., Jr., Porter, C. W. and Bernacki, R. J. (1982) Activity of tunicamycin against *Trypanosoma brucei* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* **22**, 1008-1011
- 119 Dixon, H., Ginger, C. D. and Williamson, J. (1971) The lipid metabolism of blood and culture forms of *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma rhodesiense*. *Comp Biochem Physiol B.* **39**, 247-266
- 120 Barrett, M. P., Boykin, D. W., Brun, R. and Tidwell, R. R. (2007) Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol.* **152**, 1155-1171

- 121 Priotto, G., Fogg, C., Balasegaram, M., Erphas, O., Louga, A., Checchi, F., Ghabri, S. and Piola, P. (2006) Three drug combinations for late-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: a randomized clinical trial in Uganda. *PLoS Clin Trials*. **1**, e39
- 122 De Koning, H. P. and Jarvis, S. M. (2001) Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta Trop*. **80**, 245-250
- 123 Bronner, U., Doua, F., Ericsson, O., Gustafsson, L. L., Miezán, T. W., Rais, M. and Rombo, L. (1991) Pentamidine concentrations in plasma, whole blood and cerebrospinal fluid during treatment of *Trypanosoma gambiense* infection in Cote d'Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **85**, 608-611
- 124 Bronner, U., Ericsson, O., Nordin, J., Wikstrom, I., Abdi, Y. A., Hall, J. E., Tidwell, R. R. and Gustafsson, L. L. (1995) Metabolism is an important route of pentamidine elimination in the rat: disposition of <sup>14</sup>C-pentamidine and identification of metabolites in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Pharmacol Toxicol*. **77**, 114-120
- 125 Bronner, U., Gustafsson, L. L., Doua, F., Ericsson, O., Miezán, T., Rais, M. and Rombo, L. (1995) Pharmacokinetics and adverse reactions after a single dose of pentamidine in patients with *Trypanosoma gambiense* sleeping sickness. *Br J Clin Pharmacol*. **39**, 289-295
- 126 Wang, C. C. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **35**, 93-127
- 127 Robertson, D. H. (1963) The treatment of sleeping sickness (mainly due to *Trypanosoma rhodesiense*) with melarsoprol. I. Reactions observed during treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **57**, 122-133
- 128 Robertson, D. H. (1963) The treatment of sleeping sickness (mainly due to *Trypanosoma rhodesiense*) with melarsoprol. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **57**, 176-183
- 129 Jennings, F. W., Whitelaw, D. D., Holmes, P. H., Chizyuka, H. G. and Urquhart, G. M. (1979) The brain as a source of relapsing *Trypanosoma brucei* infection in mice after chemotherapy. *Int J Parasitol*. **9**, 381-384
- 130 Pardridge, W. M. (1999) Non-invasive drug delivery to the human brain using endogenous blood-brain barrier transport systems. *Pharm Sci Technolo Today*. **2**, 49-59

- 131 Cornford, E. M. and Cornford, M. E. (2002) New systems for delivery of drugs to the brain in neurological disease. *Lancet Neurol.* **1**, 306-315
- 132 Mollgaard, K. and Saunders, N. R. (1975) Complex tight junctions of epithelial and of endothelial cells in early foetal brain. *J Neurocytol.* **4**, 453-468
- 133 Rapoport, S. I. and Robinson, P. J. (1986) Tight-junctional modification as the basis of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci.* **481**, 250-267
- 134 Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* **57**, 173-185
- 135 Del Zoppo, G. J., Milner, R., Mabuchi, T., Hung, S., Wang, X. and Koziol, J. A. (2006) Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem Soc Trans.* **34**, 1261-1266
- 136 Erickson, A. C. and Couchman, J. R. (2000) Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem.* **48**, 1291-1306
- 137 Virgintino, D., Monaghan, P., Robertson, D., Errede, M., Bertossi, M., Ambrosi, G. and Roncali, L. (1997) An immunohistochemical and morphometric study on astrocytes and microvasculature in the human cerebral cortex. *Histochem J.* **29**, 655-660
- 138 Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J. and Bonvento, G. (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia.* **23**, 1-10
- 139 Begley, D. J. (2004) ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des.* **10**, 1295-1312
- 140 Begley, D. J. (2004) Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther.* **104**, 29-45
- 141 Ferte, J. (2000) Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem.* **267**, 277-294
- 142 Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M. P. and Fenart, L. (2007) Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* **6**, 650-661



- 143 Vannucci, S. J., Maher, F. and Simpson, I. A. (1997) Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*. **21**, 2-21
- 144 Moos, T. and Morgan, E. H. (2000) Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol Neurobiol*. **20**, 77-95
- 145 Moos, T., Trinder, D. and Morgan, E. H. (2000) Cellular distribution of ferric iron, ferritin, transferrin and divalent metal transporter 1 (DMT1) in substantia nigra and basal ganglia of normal and beta2-microglobulin deficient mouse brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. **46**, 549-561
- 146 Demeule, M., Poirier, J., Jodoin, J., Bertrand, Y., Desrosiers, R. R., Dagenais, C., Nguyen, T., Lanthier, J., Gabathuler, R., Kennard, M., Jefferies, W. A., Karkan, D., Tsai, S., Fenart, L., Cecchelli, R. and Beliveau, R. (2002) High transcytosis of melanotransferrin (P97) across the blood-brain barrier. *J Neurochem*. **83**, 924-933
- 147 Fillebeen, C., Descamps, L., Dehouck, M. P., Fenart, L., Benaissa, M., Spik, G., Cecchelli, R. and Pierce, A. (1999) Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J Biol Chem*. **274**, 7011-7017
- 148 Duffy, K. R. and Pardridge, W. M. (1987) Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain Res*. **420**, 32-38
- 149 Fishman, J. B., Rubin, J. B., Handrahan, J. V., Connor, J. R. and Fine, R. E. (1987) Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. *J Neurosci Res*. **18**, 299-304
- 150 Miller, D. W., Keller, B. T. and Borchardt, R. T. (1994) Identification and distribution of insulin receptors on cultured bovine brain microvessel endothelial cells: possible function in insulin processing in the blood-brain barrier. *J Cell Physiol*. **161**, 333-341
- 151 Abbott, N. J., Ronnback, L. and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. **7**, 41-53
- 152 Matovu, E., Stewart, M. L., Geiser, F., Brun, R., Maser, P., Wallace, L. J., Burchmore, R. J., Enyaru, J. C., Barrett, M. P., Kaminsky, R., Seebeck, T. and de Koning, H. P. (2003) Mechanisms of arsenical and diamidine uptake and resistance in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. **2**, 1003-1008
- 153 Scott, J. M. and Pegram, R. G. (1974) A high incidence of *Trypanosoma congolense* strains resistant to homidium bromide in Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*. **6**, 215-221

- 154 Geerts, S., Holmes, P. H., Eisler, M. C. and Diall, O. (2001) African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. *Trends Parasitol.* **17**, 25-28
- 155 Frommel, T. O. and Balber, A. E. (1987) Flow cytofluorimetric analysis of drug accumulation by multidrug-resistant *Trypanosoma brucei brucei* and *T. b. rhodesiense*. *Mol Biochem Parasitol.* **26**, 183-191
- 156 Mulugeta, W., Wilkes, J., Mulatu, W., Majiwa, P. A., Masake, R. and Peregrine, A. S. (1997) Long-term occurrence of *Trypanosoma congolense* resistant to diminazene, isometamidium and homidium in cattle at Ghibe, Ethiopia. *Acta Trop.* **64**, 205-217
- 157 Wilkes, J. M., Mulugeta, W., Wells, C. and Peregrine, A. S. (1997) Modulation of mitochondrial electrical potential: a candidate mechanism for drug resistance in African trypanosomes. *Biochem J.* **326** ( Pt 3), 755-761
- 158 Carter, N. S. and Fairlamb, A. H. (1993) Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature.* **361**, 173-176
- 159 Ross, C. A. and Barns, A. M. (1996) Alteration to one of three adenosine transporters is associated with resistance to cymelarsan in *Trypanosoma evansi*. *Parasitol Res.* **82**, 183-188
- 160 Carter, N. S., Barrett, M. P. and de Koning, H. P. (1999) A drug resistance determinant in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol.* **7**, 469-471
- 161 Apted, F. I. (1965) Trypanosomiasis. African Trypanosomiasis: Human. *Trop Dis Bull.* **62**, 369-383
- 162 Brun, R., Blum, J., Chappuis, F. and Burri, C. (2009) Human African trypanosomiasis. *Lancet.* **375**, 148-159
- 163 De Deken, R., Geerts, S., Kageruka, P., Ceulemans, F., Brandt, J., Schacht, E., Pascucci, C. and Lootens, C. (1989) Chemoprophylaxis of trypanosomiasis, due to *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense*, in rabbits using a slow release device containing homidium bromide. *Ann Soc Belg Med Trop.* **69**, 291-296
- 164 Geerts, S., De Deken, R., Kageruka, P., Lootens, K. and Schacht, E. (1993) Evaluation of the efficacy of a slow release device containing homidium bromide in rabbits infected with *Trypanosoma congolense*. *Vet Parasitol.* **50**, 15-21
- 165 Kageruka, P., Kabore, H., Marcotty, T., Ibouesse, J. F., De Deken, R., Geerts, S., Lemmouchi, Y. and Schacht, E. (1996) Comparative evaluation of the prophylactic effect of

slow release devices containing homidium bromide and isometamidium on *Trypanosoma congolense* in rabbits. *Vet Parasitol.* **63**, 179-185

166 Gibaud, S., Gaia, A. and Astier, A. (2002) Slow-release melarsoprol microparticles. *Int J Pharm.* **243**, 161-166

167 Antimisiaris, S. G., Klepetsanis, P., Zachariou, V., Giannopoulou, E. and Ioannou, P. V. (2005) In vivo distribution of arsenic after i.p. injection of arsonoliposomes in balb-c mice. *Int J Pharm.* **289**, 151-158

168 Zagana, P., Haikou, M., Klepetsanis, P., Giannopoulou, E., Ioannou, P. V. and Antimisiaris, S. G. (2008) In vivo distribution of arsonoliposomes: effect of vesicle lipid composition. *Int J Pharm.* **347**, 86-92

169 Zagana, P., Klepetsanis, P., Ioannou, P. V., Loiseau, P. M. and Antimisiaris, S. G. (2007) Trypanocidal activity of arsonoliposomes: effect of vesicle lipid composition. *Biomed Pharmacother.* **61**, 499-504

170 Papagiannaros, A., Bories, C., Demetzos, C. and Loiseau, P. M. (2005) Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. *Biomed Pharmacother.* **59**, 545-550

171 Samain, D., De Miguel, I., N'guyen, F., Delrieu, P., Ding, L., Candelotto, N., Segreto, C., Betbeder, D., Kravtsoff, R. and Major, M. (2002) Synthetic particulate vectors and preparation process. Patent US 2002/0168408 A1, Example 7: preparation of cationic polysaccharide cores (PCS)

172 Castignolles, N., Morgeaux, S., Gontier-Jallet, C., Samain, D., Betbeder, D. and Perrin, P. (1996) A new family of carriers (biovectors) enhances the immunogenicity of rabies antigens. *Vaccine.* **14**, 1353-1360

173 Prieur, E., Betbeder, D., Niedergang, F., Major, M., Alcover, A., Davignon, J. L. and Davrinche, C. (1996) Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-early protein (IE1) with 80 nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4<sup>+</sup> T-cell clones in vitro. *Vaccine.* **14**, 511-520

174 Major, M., Prieur, E., Tocanne, J. F., Betbeder, D. and Sautereau, A. M. (1997) Characterization and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles. *Biochim Biophys Acta.* **1327**, 32-40

- 175 Delval, F., Crini, G. and Vebrel, J. (2006) Removal of organic pollutants from aqueous solutions by adsorbents prepared from an agroalimentary by-product. *Bioresour Technol.* **97**, 2173-2181
- 176 Crini, G. and Badot, P. M. (2007) Traitement et épuration des eaux industrielles polluées : Procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique Presses Universitaires de Franche-Comté. **chapitre: de l'amidon pour adsorber des colorants**, 200-204
- 177 Delval, F., Crini, G., Bertini, S., Morin-Crini, N., Badot, P. M., Vebrel, J. and Torri, G. (2004) Characterization of crosslinked starch materials with spectroscopic techniques. *Journal of Applied Polymer Science.* **93**, 2650-2663
- 178 Santos, N. C., Sousa, A. M. A., Betbeder, D., Prieto, M. and Castanho, M. A. R. B. (1997) Structural characterization of organized systems of polysaccharides and phospholipids by light scattering spectroscopy and electron microscopy. *Carbohydr. Res.* **300**, 31-40
- 179 Loiseau, P. M., Imbertie, L., Bories, C., Betbeder, D. and De Miguel, I. (2002) Design and antileishmanial activity of amphotericin B-loaded stable ionic amphiphile biovector formulations. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**, 1597-1601
- 180 Paillard, A., Passirani, C., Saulnier, P., Kroubi, M., Garcion, E., Benoit, J. P. and Betbeder, D. (2009) Positively-Charged, Porous, Polysaccharide Nanoparticles Loaded with Anionic Molecules Behave as 'Stealth' Cationic Nanocarriers. *Pharm Res*
- 181 Jallouli, Y., Paillard, A., Chang, J., Sevin, E. and Betbeder, D. (2007) Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood-brain barrier in vitro. *Int J Pharm.* **344**, 103-109
- 182 Bittner, B. and Mountfield, R. J. (2002) Intravenous administration of poorly soluble new drug entities in early drug discovery: the potential impact of formulation on pharmacokinetic parameters. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **5**, 59-71
- 183 Mountfield, R. J., Senepin, S., Schleimer, M., Walter, I. and Bittner, B. (2000) Potential inhibitory effects of formulation ingredients on intestinal cytochrome P450. *Int J Pharm.* **211**, 89-92
- 184 Coon, J. S., Knudson, W., Clodfelter, K., Lu, B. and Weinstein, R. S. (1991) Solutol HS 15, Nontoxic Polyoxyethylene Esters of 12-Hydroxystearic Acid, Reverses Multidrug Resistance. *Cancer research.* **51**, 897-902

- 185 Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E. and Benoit, J. P. Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci.* **40**, 422-429
- 186 Atsriku, C., Watson, D. G., Tettey, J. N., Grant, M. H. and Skellern, G. G. (2002) Determination of diminazene aceturate in pharmaceutical formulations by HPLC and identification of related substances by LC/MS. *J Pharm Biomed Anal.* **30**, 979-986
- 187 Kroubi, M., Dauloued, S., Karembe, H., Jallouli, Y., Howsam, M., Mossalayi, D., Vincendeau, P. and Betbeder, D. (2010) Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African Trypanosomiasis.
- 188 Paul, M., Fessi, H., Laatiris, A., Boulard, Y., Durand, R., Deniau, M. and Astier, A. (1997) Pentamidine-loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: physicochemical properties and stability work. *International Journal of Pharmaceutics.* **159**, 223-232
- 189 Alving, C. R. (1986) Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. *Parasitol Today.* **2**, 101-107
- 190 Tachibana, H., Yoshihara, E., Kaneda, Y. and Nakae, T. (1988) In vitro lysis of the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei gambiense* by stearylamine-bearing liposomes. *Antimicrob Agents Chemother.* **32**, 966-970
- 191 Yongsheng, Y., Yongchun, O., Chengmai, R., Yuanguo, C. and Fenqin, Z. (1996) Trypanocidal value of liposomal diminazene in experimental *Trypanosoma brucei evansi* infection in mice. *Vet Parasitol.* **61**, 349-352
- 192 Yoshihara, E., Tachibana, H. and Nakae, T. (1987) Trypanocidal activity of the stearylamine-bearing liposome in vitro. *Life Sci.* **40**, 2153-2159
- 193 Rippe, B., Venturoli, D., Simonsen, O. and de Arteaga, J. (2004) Fluid and electrolyte transport across the peritoneal membrane during CAPD according to the three-pore model. *Perit Dial Int.* **24**, 10-27
- 194 Ito, T., Yorioka, N., Kyuden, Y., Asakimori, Y., Kiribayashi, K., Ogawa, T. and Kohno, N. (2003) Effect of glucose polymer on the intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. *Nephron Clin Pract.* **93**, c97-105
- 195 Ito, T., Yorioka, N., Yamamoto, M., Kataoka, K. and Yamakido, M. (2000) Effect of glucose on intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol.* **11**, 1969-1979

- 196 Owens, D. E., 3rd and Peppas, N. A. (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* **307**, 93-102
- 197 Gangneux, J. P., Sulahian, A., Garin, Y. J., Farinotti, R. and Derouin, F. (1996) Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**, 1214-1218
- 198 Gradoni, L., Davidson, R. N., Orsini, S., Betto, P. and Giambenedetti, M. (1993) Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania infantum* and tissue distribution in mice. *J Drug Target.* **1**, 311-316
- 199 Oliva, G., Gradoni, L., Ciaramella, P., De Luna, R., Cortese, L., Orsini, S., Davidson, R. N. and Persechino, A. (1995) Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Antimicrob Chemother.* **36**, 1013-1019
- 200 Tempone, A. G., Mortara, R. A., de Andrade, H. F., Jr. and Reimao, J. Q. (2010) Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents*
- 201 Gupta, S., Pal, A. and Vyas, S. P. (2010) Drug delivery strategies for therapy of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Drug Deliv.* **7**, 371-402
- 202 Beduneau, A., Saulnier, P., Anton, N., Hindre, F., Passirani, C., Rajerison, H., Noiret, N. and Benoit, J. P. (2006) Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties. *Pharm Res.* **23**, 2190-2199
- 203 Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P. and Benoit, J. P. (2006) Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials.* **27**, 4356-4373
- 204 Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Simard, P., Leroux, J. C. and Benoit, J. P. (2006) Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A.* **78**, 620-628
- 205 Passirani, C., Barratt, G., Devissaguet, J. P. and Labarre, D. (1998) Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate). *Pharm Res.* **15**, 1046-1050
- 206 Roser, M., Fischer, D. and Kissel, T. (1998) Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm.* **46**, 255-263

- 207 Toufik, J. and Labarre, D. (1995) Relationship between reduction of complement activation by polysaccharide surfaces bearing diethylaminoethyl groups and their degree of substitution. *Biomaterials*. **16**, 1081-1088
- 208 Carreno, M. P., Labarre, D., Jozefowicz, M. and Kazatchkine, M. D. (1988) The ability of Sephadex to activate human complement is suppressed in specifically substituted functional Sephadex derivatives. *Mol Immunol*. **25**, 165-171
- 209 Cornford, E. M. and Hyman, S. (2005) Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx*. **2**, 27-43
- 210 Pan, W., Kastin, A. J., Zankel, T. C., van Kerkhof, P., Terasaki, T. and Bu, G. (2004) Efficient transfer of receptor-associated protein (RAP) across the blood-brain barrier. *J Cell Sci*. **117**, 5071-5078
- 211 Pardridge, W. M. (1999) Vector-mediated drug delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev*. **36**, 299-321
- 212 Drin, G., Rousselle, C., Scherrmann, J. M., Rees, A. R. and Temsamani, J. (2002) Peptide delivery to the brain via adsorptive-mediated endocytosis: advances with SynB vectors. *AAPS PharmSci*. **4**, E26
- 213 Scherrmann, J. M. (2002) Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol*. **38**, 349-354
- 214 Woodman, S. E., Benveniste, E. N., Nath, A. and Berman, J. W. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 TAT protein induces adhesion molecule expression in astrocytes. *J Neurovirol*. **5**, 678-684
- 215 Weinbaum, S., Tarbell, J. M. and Damiano, E. R. (2007) The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*. **9**, 121-167
- 216 Vorbrod, A. W., Lossinsky, A. S., Dobrogowska, D. H. and Wisniewski, H. M. (1986) Distribution of anionic sites and glycoconjugates on the endothelial surfaces of the developing blood-brain barrier. *Brain Res*. **394**, 69-79
- 217 Robinson, M. S. (1994) The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*. **6**, 538-544
- 218 Stewart, P. A. (2000) Endothelial vesicles in the blood-brain barrier: are they related to permeability? *Cell Mol Neurobiol*. **20**, 149-163

- 219 Ghosh, R. N. and Maxfield, F. R. (1995) Evidence for nonvectorial, retrograde transferrin trafficking in the early endosomes of HEP2 cells. *J Cell Biol.* **128**, 549-561
- 220 Dunn, K. W. and Maxfield, F. R. (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J Cell Biol.* **117**, 301-310
- 221 Dunn, K. W., McGraw, T. E. and Maxfield, F. R. (1989) Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J Cell Biol.* **109**, 3303-3314