

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2012

THESE N°

**ACTIVITE TRYPANOCIDE DU MEGAZOL SUR LE MODELE MURIN A *TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI* :
RECHERCHE D'UNE DOSE EFFICACE ET IDENTIFICATION DES METABOLITES**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le vendredi 6 juillet 2012

par

Elie MESPOULET

Né le 26 Février 1986, à St Quentin

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Gilles DREYFUSS, PU..... Président
M le Docteur Bertrand COURTIOUX, MCU..... Juge
M le Docteur Nicolas PICARD, MCU, PH Juge
M le Docteur Bernard MORVAN Membre invité

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**
1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences
2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOU Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
ODART Nicole	PHARMACOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES
PHARMACEUTIQUES** :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

VIANA Marylène

PHARMACOTECHNIE

VIGNOLES Philippe

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
INFORMATIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE :

MARBOUTY Jean-Michel

ANGLAIS

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

IMBERT Laurent

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

Remerciements

À Mr le Professeur Gilles Dreyfuss

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être le Président du Jury de cette thèse, pour l'implication que vous mettez à passionner les foules d'étudiants en pharmacie, qui trop souvent s'arrachent les premières places pour assister à vos cours. Mais également pour votre immense gentillesse.

À Mr le docteur Bertrand Courtioux

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de diriger mon travail, toujours avec distinction ; pour votre gentillesse votre disponibilité au quotidien et pour le tutoiement à votre égard que vous m'avez imposé d'utiliser depuis notre première rencontre.

À Mr le docteur Nicolas Picard

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de participer au Jury de cette thèse, pour votre disponibilité, votre attention et votre aide précieuse dans l'élaboration de cette étude.

À Mr le docteur Bernard Morvan

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de participer à ce jury de thèse et de vous être déplacé pour cela. Je vous remercie également de nous avoir gracieusement fourni la matière première de ce travail, le Mégazol.

Je remercie Mr le Professeur Dumas et Mr le docteur Bertin Enanga pour avoir appuyé et initié ce projet.

Je remercie Mr le Professeur Pierre Marie Preux et M^{me} la Professeur Marie Laure Dardé pour avoir généreusement accepté de financer des manipulations parfois onéreuses, et pour m'avoir admis au sein de l'équipe Inserm UMR-1094 de neuro-épidémiologie tropicale.

Je remercie tout particulièrement Mr le Professeur Mourad Kaouadji, qui a su nous conseiller judicieusement par son expérience et son savoir immense, je le remercie d'autant plus, pour sa participation aux hypothèses concernant les structures moléculaires des métabolites du Mégazol.

Je remercie M^{lle} Emilie Pinault pour sa disponibilité et pour avoir réalisé avec brio de longues évaporations et manipulations permettant la réussite de l'étude des métabolites. Je remercie au passage également Mr François-Ludovic Sauvage pour ses conseils avisés de chromatographie liquide et Mr Jean-Hervé Comte

pour sa gentillesse et le savoir faire qu'il m'a apporté pour la réalisation des incubations de microsomes hépatiques.

Je remercie Mr le Professeur Pierre Marquet pour avoir permis l'usage du matériel haute performance du service commun de recherche et d'analyse des biomolécules du limousin (SCRABL) et pour nous avoir donné ses précieux avis concernant nos travaux.

Je remercie Mme la docteur Sylvie Bisser pour ses relectures et tout l'intérêt porté à ces travaux.

Je remercie Mr François Dalmay pour son travail statistique.

Je remercie Nicole et Elisabeth pour leurs articles, leurs bonnes humeurs et leurs sourires.

Je remercie Mr James Javellaud pour m'avoir prêté les cages à métabolismes, mais également Sylvie et tout le personnel de l'animalerie. J'adresse au passage, un remerciement tout honteux à ces souris qui ont donné de leur vie pour cette étude, notamment Rebecca, Azalée et Elvire.

Je remercie Jenny, Martine, Roseline, Félicité, Nadia, Rima, Patacharee, Fateen, Nor, Adnan, Moustapha, Karim, Lucille, Arianne (pour la pagination incompréhensible, les concepteurs de Word doivent avoir plusieurs suicides sur la conscience) pour, ensemble, permettre la qualité de vie qui est la notre au quatrième étage.

Je remercie Celine Calonge pour tous ses précieux avis scientifiques.

Je remercie les Docteurs, Noumani, Schuster, Roulland, mes deux binômes de TP, et également M^{lle} la Dr Vigier pour ses relectures, mais également l'auteur du désormais célèbre best seller « Moi, Joris Crabos, pharmacien de nuit, mes aventures, ma vie » ainsi que M^{lles} Emmanuelle Mariaux, Anne Seegers.

Je remercie ma famille en général, notamment les plus proches, pour entre autre, m'avoir nourri et aussi donné la vie, mais également ceux qui ne sont éloignés que géographiquement. Je dédie ce modeste travail à Sophien et à mes grands parents ; à ceux que je n'ai pas connu et à ceux que je n'ai que trop peu connu.

Je remercie M^{lle} Mériquet pour son incommensurable patience et puis pour tout le reste aussi.

Enfin, je remercie tous les gens que j'oublie et qui ne m'en voudront pas pour si peu.

Abréviations

ACN	ACétoNitrile
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
ADNmt	Acide Désoxyribo-Nucléique mitochondriale
AdoMet	Adenosyl-Méthionine
AdoMetDC	Adenosyl-Méthionine decarboxylase
ARN	Acide Ribo-Nucléique
ARNm	Acide Ribo-Nucléique messenger
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CATT	Card Agglutination Trypanosomiasis Test
CE	Collision Energy
CES	Collision Energy Spread
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPS	Coups
CXP	Collision cell eXit Potential
DFMO	Difluoromethylornithine ou éflornithine
DL₅₀	Dose Létale, qui entraîne 50% de mort dans un lot
DMSO	DiMethylSulfOxyde
DMT	Dose Maximale Tolérée
DND<i>i</i>	Drugs for Neglected Diseases initiative
DP	Declustering Potential
EATRO	East African Trypanosomiasis Research Organization
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays
EMS	Enhanced Mass Spectrometry
EP	Entrance Potential

EPI	Enhanced Product Ion
ESI	turbo Ion Spray
FIND	Foundation for Innovative New Diagnostics
FR	Fumarate Réductase
Fru(2,6)P₂	Fructose-2,6-bisphosphatase
GUS	General Unknown Screening
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HPLC/MS	Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse
IDA	Information-Dependent Acquisition
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IM	Intra Musculaire
Inf + ou –	Souris infectées ou souris non infectées
iNOS	inductible Nitric Oxide Synthase
IP	Intra Péritonéale
IS	Ion Spray
IV	Intra Veineuse
K_i	constante de dissociation, ou d'inhibition
LC/MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
LC/MS/MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LDL	Low Density Lipoprotein, lipoprotéines de faible densité
LPS	Lipo-PolySaccharides
M	Masse molaire
m/z	Rapport de la masse atomique <i>m</i> sur la charge élémentaire <i>z</i> d'un ion
m-AECT	miniature Anion Exchange Centrifugation Technique
MMP	Matrix MetalloProteases

MRM	Multiple Reaction Monitoring
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NF-κB	Nuclear factor κ B
NI	Non Identifié
NK	cellule Natural Killer
NO	Monoxyde d'azote
NT	souris Non Traitées
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économique
ODC	Ornithine Décarboxylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P2	transporteurs de purines
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFK	PhosphoFructo-Kinase
PG	ProstaGlandine
PL	Ponction Lombaire
PLSD	Protected Least Significant Difference
PO	<i>Per Os</i> ou voie orale
Q1, 2, 3	premier deuxième troisième Quadropole du spectromètre de masse
QBC	Quantitative Buffy Coat
SCRABL	Service Commun de Recherche et d'Analyse des Biomolécules du Limousin
SI	Standard Interne
SNC	Système Nerveux Central
SOCS	Suppressors Of Cytokine Signaling
SOD	Super Oxyde Dismutase
SRM	Selected Reaction Monitoring
$t_{1/2}$	Temps pour lequel la concentration détectée a diminué de moitié
Th 1	Lymphocytes T helper de type 1

Th 2	Lymphocytes T helper de type 2
THA	Trypanosomose Humaine Africaine
TLR	Toll-Like Receptor
TLTF	Trypanosome Lymphocyte-Triggering Factor ou Trypanine
<i>Tmax</i>	Temps pour lequel la concentration détectée est maximale
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TR	Temps de Rétention
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSG	Variant Surface Glycoprotein

Sommaire

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION.....	6
GENERALITES.....	7
LE MEGAZOL	41
OBJECTIFS.....	53
MATERIEL ET METHODES	54
RESULTATS	67
DISCUSSION.....	88
BIBLIOGRAPHIE.....	98
ANNEXES.....	116
TABLE DES FIGURES	128
TABLE DES TABLEAUX.....	130
TABLE DES MATIERES.....	131
SERMENT DE GALIEN	134

Introduction

La trypanosomose humaine Africaine (THA) est une parasitose endémique touchant actuellement trente six pays d'Afrique subsaharienne (Simarro *et al*, 2011) situés entre le 15° de latitude nord et le 23° de latitude sud (Bisser *et al*, 2012).

La maladie est due à un protozoaire flagellé sanguicole du genre *Trypanosoma* transmis par son vecteur hématophage, la mouche tsétsé (genre *Glossina*). Une fois inoculé, le parasite migre jusqu'à atteindre le système lymphatique et sanguin. C'est le stade I ou stade lymphatico-sanguin de la maladie avec des signes cliniques comme les adénopathies palpables. Par la suite, le parasite peut traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et atteindre le système nerveux central (SNC), il s'agit alors du stade II ou stade nerveux de la maladie (Kennedy, 2004). Le patient développe alors des signes d'atteinte nerveuse, avec des troubles de la marche, et du sommeil, ce dernier ayant donné son nom à cette pathologie, « la maladie du sommeil ». En l'absence de traitement l'évolution est le plus souvent mortelle (Dumas *et al*, 1999).

Depuis le siècle dernier, il existe des traitements « stades dépendants », or plusieurs critères caractérisent les médicaments actuellement disponibles pour traiter le stade nerveux de la maladie :

- ✓ toxiques (Mélarsoprol avec ses encéphalites réactives, et DFMO (Difluoromethylornithine) avec ses effets indésirables d'anticancéreux)
- ✓ coûteux (inconvenient momentanément aboli grâce aux efforts communs de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et de Sanofi-Aventis)
- ✓ d'utilisation délicate (injections IV (Intra Veineuses) douloureuses et répétées, suivi dans le temps, risque de mutation vers des souches résistantes et risques de rechutes).

Rappelons brièvement les caractéristiques du médicament idéal tel que le rêve tout pharmacien : ce médicament doit être peu onéreux à la production et à l'achat, atoxique, actif à faibles doses, de prise aisée préférentiellement en une seule prise et par voie orale, avoir une marge thérapeutique assez large et être éliminé rapidement. C'est à partir de cette simple comparaison que l'on peut déduire que la recherche de traitements contre la maladie du sommeil est loin d'être achevée et nécessite encore beaucoup d'attention.

Notre travail va tout d'abord rappeler des notions générales actualisées sur la THA dans le domaine de l'épidémiologie, du diagnostic, de l'immunopathologie de la maladie, des traitements actuels et avenir ainsi que des généralités sur la métabolisation. Par la suite seront présentés, les travaux entourant le Mégazol depuis sa découverte jusqu'à nos jours. Après cela, les objectifs de ce travail seront exposés, suivis de la partie matériel et méthodes. Enfin, les résultats seront présentés puis discutés.

1. Généralités

1.1. Épidémiologie

Environ soixante millions de personnes vivant dans des régions rurales d'Afrique subsaharienne en contact avec le vecteur de la maladie sont exposées. Sur cet ensemble, seulement 5 millions bénéficient d'une surveillance régulière. On distingue deux types de maladie du sommeil. Le premier, responsable dans presque tous les cas de trypanosomose est dû à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) qui entraîne une forme chronique de la maladie et qui se retrouve surtout en Afrique de l'Ouest et Centrale, le second type est la forme aiguë de la maladie, dû à *T. b. rhodesiense* que l'on retrouve principalement en Afrique du Sud et de l'Est (figure 1) (Brun *et al*, 2010). Cependant cette frontière géographique n'est pas fixe notamment avec l'extension de *T. b. rhodesiense* par exemple en Ouganda (Picozzi *et al*, 2005).

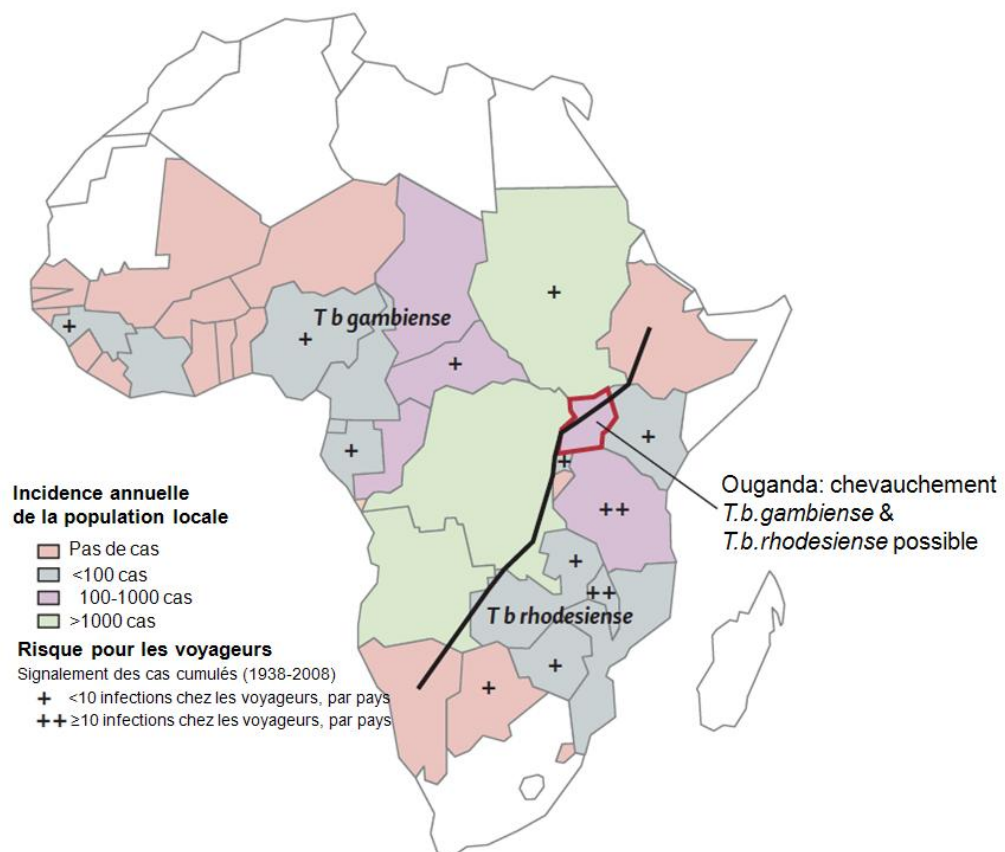


Figure 1 : Distribution géographique de l'incidence annuelle de la trypanosomose humaine africaine et du risque pour les voyageurs, La ligne noire divise les territoires dans lesquels sévit principalement *T. b. gambiense* de ceux où prédominent les infections à *T. b. rhodesiense* (Brun *et al*, 2010)

Le continent Africain a été touché par trois grandes épidémies durant le siècle passé (Steverding, 2008). La première, de 1896 à 1906, a touché principalement l'Afrique équatoriale et a entraîné près de 800 000 morts (Louis *et al*, 2005). La seconde a eu lieu de 1920 jusqu'à la fin des années 1940. Les puissances coloniales ont alors investi dans la lutte anti vectorielle et dans des équipes mobiles chargées de la surveillance médicale de la population, deux stratégies qui restent des piliers dans le contrôle de la maladie. Jusqu'aux années 1960, ces stratégies avaient presque permis une éradication de la maladie, mais l'indépendance des pays Africains et les conflits en découlant ont entraîné un quasi arrêt de ces activités de surveillance et de contrôle dans les zones endémiques. Ainsi, l'épidémie est progressivement réapparue une troisième fois (figure 2), jusqu'à atteindre de nouveau un pic dans les années 1990 en République Démocratique du Congo, en Angola, en République Centrafricaine, dans le sud du Soudan et de l'Ouganda (Smith *et al*, 1998).

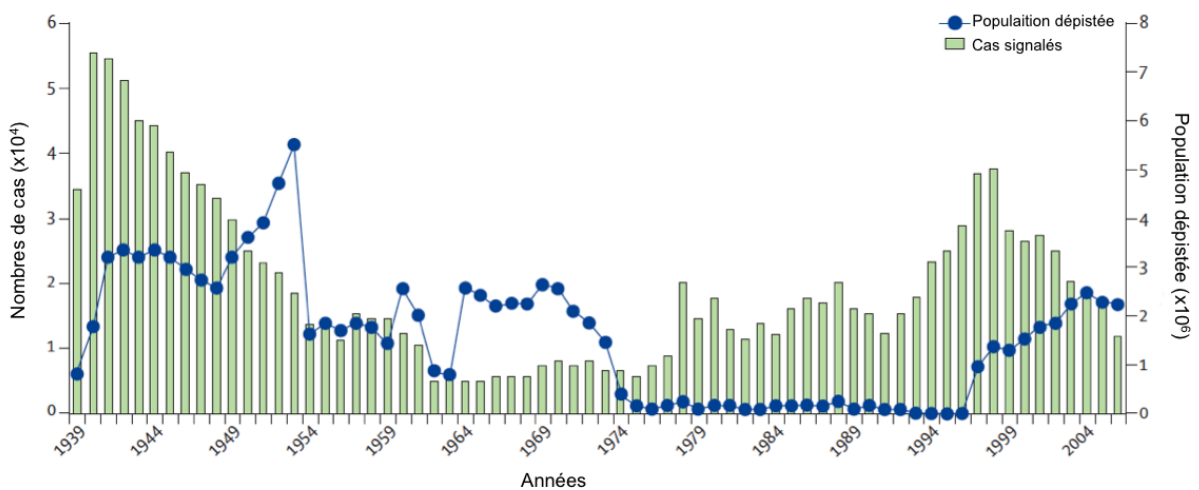


Figure 2 : *T. b. gambiense* : comparaison dans le temps, entre les personnes placées sous surveillance active et les nouveaux cas détectés. (Nombre des cas signalé (colonnes) et campagnes de prospections ou population dépistée (cercles), Afrique, 1939-2004 (Brun *et al*, 2010).

Depuis les années 2000 il y a une forte réduction du nombre de cas jusqu'à parler actuellement d'un éventuel contrôle de la maladie dans les zones endémiques (figure 2). Ces changements épidémiologiques sont dus à différents facteurs:

- ✓ La fin des conflits sociaux et civils en Angola, au Congo, en Ouganda, en République Centrafricaine, en République Démocratique du Congo et au Soudan, ce qui a permis de rétablir l'accès aux zones d'endémie.

- ✓ Un partenariat entre l'OMS et Sanofi-Aventis depuis 2001 (renouvelé en 2006) qui a permis de faciliter l'accès et la distribution de la plupart des médicaments spécifiques de la THA (Simarro *et al*, 2011).
- ✓ L'engagement des organisations non gouvernementales à lutter contre la maladie dans le cadre de leurs projets d'urgence.
- ✓ La mise en place de projets de coopérations bilatéraux belge, français et espagnol dans la lutte contre la maladie.
- ✓ Une forte campagne de sensibilisation et de mise en réseau *via* l'OMS et d'autres organismes internationaux comme DNDi (Drugs for Neglected Diseases) et FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) pour permettre une meilleure prise de conscience de la maladie au sein de la communauté internationale et parmi les décideurs nationaux des pays endémiques.

Ainsi, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués est passé de 36 601 en 1997 à 17 036 en 2004. En parallèle, le nombre de personnes dépistées est passé de 1 345 809 en 1997 à 3 291 199 en 2004 (WHO, 2006). Et en 2009, le nombre de cas déclarés à l'OMS est passé sous la barre des 10 000 cas pour la première fois depuis 50 ans (Simarro *et al*, 2011). Cependant, d'autres chercheurs se sont intéressés à un modèle prenant en compte ; l'épidémiologie, le changement climatique et le parasite, pour aboutir à la conclusion que la zone géographique à risque de contamination due à la maladie du sommeil pouvait augmenter d'environ 60%, amenant un risque d'exposition d'ici 2090 de 46 à 77 millions de personnes (Moore *et al*, 2012).

1.2. Vecteur de la maladie

Les glossines sont des mouches piqueuses ou Tsaltsalya, nom donné par les éthiopiens. Ce sont des diptères brachycères Muscidae, de la sous famille des Glossinidae, du genre *Glossina* (Jordan, 1993). La tsétsé est une grosse mouche brune de 6 à 16 mm de long. Elles sont identifiables par leur trompe horizontale prolongeant le corps en avant et par leurs ailes croisées au repos (figure 3) sur le dos comme les deux lames d'une paire de ciseaux (Gentilini *et al*, 1986).



Figure 3 : Mouche tsétsé, ici *Glossina palpalis* (photo Ray Wilson, 2009).

Glossina palpalis vit autour des points d'eau de l'Afrique de l'Ouest, c'est le vecteur principal de *T. b. gambiense*. *G. tachinoïdes* vit dans les forêts galeries, c'est un vecteur important de *T. b. gambiense*. *Glossina morsitans* vit en savane sèche au contact des troupeaux d'Afrique Orientale (figure 4), c'est le vecteur de *T. b. rhodesiense* (Gentilini *et al*, 1986). La mouche pique les animaux sauvages et domestiques qui passent à sa portée.

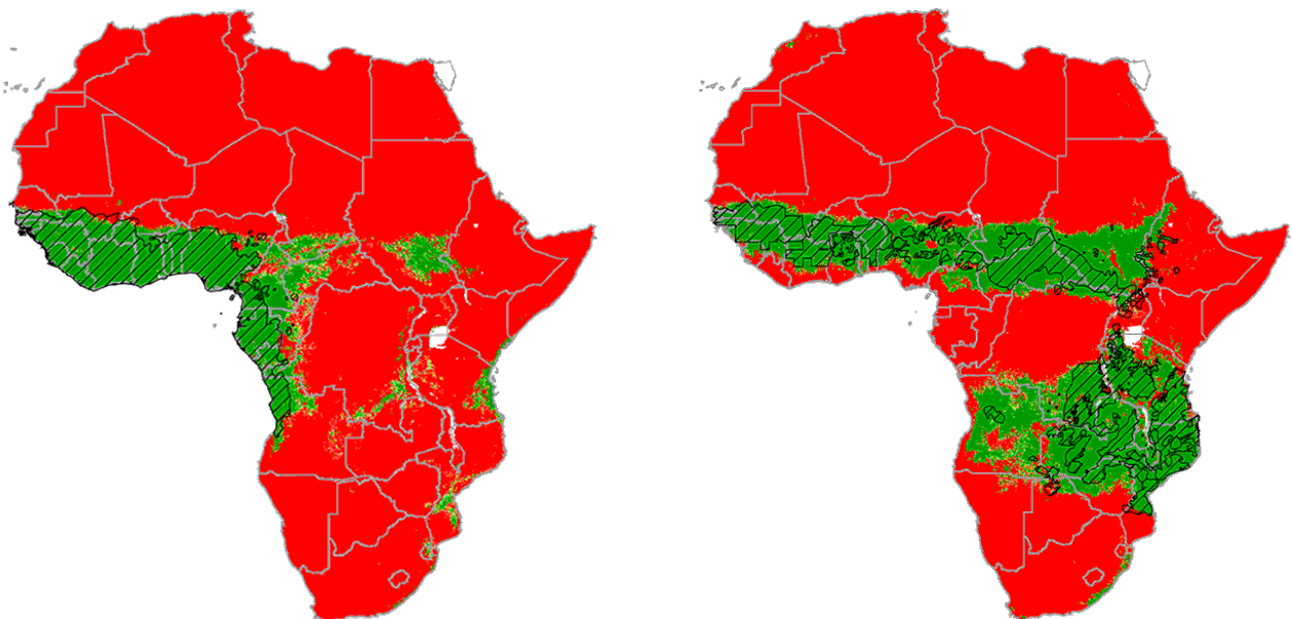


Figure 4 : Probabilité de distribution géographique de *Glossina palpalis* (carte de gauche), et de *Glossina morsitans* (carte de droite), d'après une extrapolation à partir de leur milieu de vie respectif observé par satellite. (Zone verte : probabilité de 65 à 100% ; Zone rouge : probabilité de 0 à 34,9% ; Zone rainurée : Présence observée). (Rogers *et al*, 2003).

La glossine se contamine seulement lors de son premier repas sanguin en piquant un sommeilieux. Elle ingère des trypanosomes qui subissent chez elle un cycle complexe. Trois semaines plus tard, ils réapparaissent dans les glandes salivaires de la mouche sous forme métacyclique infestante. A l'occasion d'un nouveau repas sanguin, la glossine peut transmettre l'infection en injectant sa salive virulente dans la plaie de piqûre.

La glossine est « un mauvais vecteur », en effet, elle perd des parasites en piquant aussi bien les animaux que les hommes et seuls 3 à 10 % des glossines ayant pris leur repas sanguin sur un hôte parasité deviennent infectantes ; de plus la femelle ne pond que 6 à 8 larves dans sa vie (Gentilini *et al*, 1986). Dans la nature une sur mille transmet les trypanosomes à l'homme par ses piqûres. La mouche tsétsé pique essentiellement le matin très tôt et tard le soir. Le jour, elle est active de 5 à 30 minutes et se réfugie le reste du temps dans des gîtes ombragés de faible hauteur (moins de 3 mètres ; tronc d'arbres, sous les feuilles) (Rogers, 1985).

1.3. Le parasite

Les trypanosomes sont des protozoaires sanguicoles (figure 5) constamment en mouvement grâce à leur flagelle. Ils sont longs de 15 à 30 μm avec une anatomie relativement simple (figure 6) et appartiennent à la famille des *Trypanosomatidae*.



Figure 5 : Microscopie électronique à balayage coloré de *T. brucei* dans le sang humain
(©2004 Pearson Education, Inc).

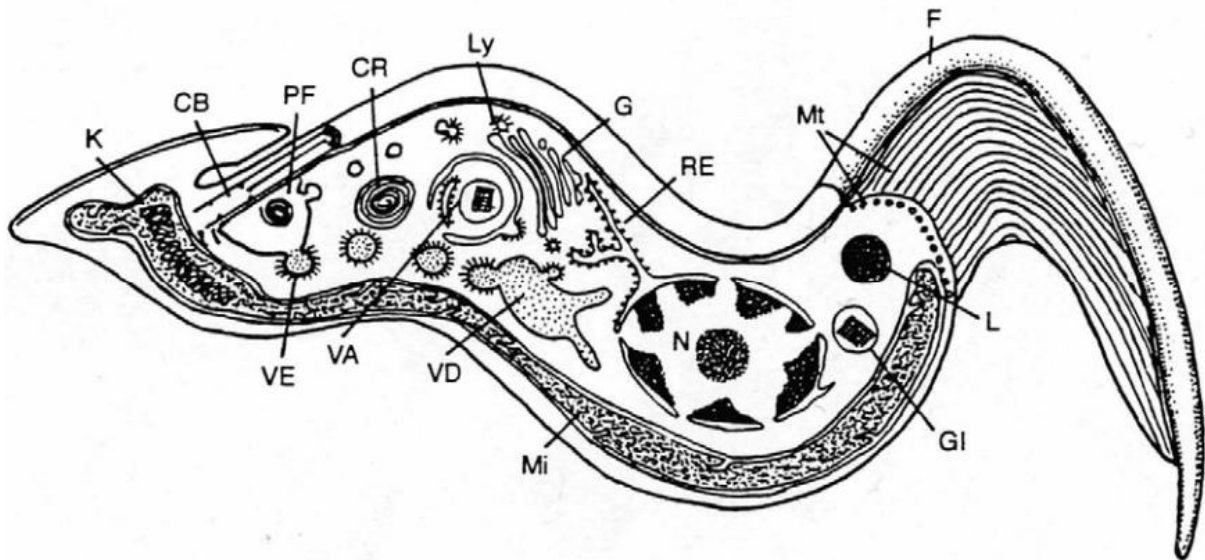


Figure 6: Anatomie du trypanosome chez l'homme sous sa forme trapue courte, d'après Cassier *et al*, 1998.

Le flagelle adhérent (F), formant une membrane ondulante, implanté par son corps basal (CB) près du kinétoplaste postérieur (K) (contenant l'ADNmt (Acide Désoxyribo-Nucléique mitochondriale)). L'appareil de Golgi (G) émet des lysosomes primaires (Ly) qui exportent leur contenu dans la poche flagellaire (PF). Les vésicules d'endocytose (VE) fusionnent pour former les vacuoles digestives (VD). Les vacuoles autophagiques (VA) évoluent en corps résiduels (CR) et sont évacuées dans la poche flagellaire. Présence de glycosomes (Gl), de lipides (L) dans le cytoplasme. Mitochondrie (Mi) ; Microtubules sous-membranaires (Mt) ; Noyau (N) ; Réticulum endoplasmique (RE).

Très répandus dans la nature, ils parasitent de nombreux vertébrés, poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères.

Tous ne sont pas pathogènes. Il en existe deux grands groupes (Voir la classification figure 7):

✓ **Les Stercoraria**, transmis par les déjections du vecteur. Exemple : *T. cruzi*, agent de la trypanosomose américaine (maladie de Chagas), dont le vecteur est une punaise appartenant à la famille des *Reduviidae*. Chez l'hôte vertébré, il comprend des formes extracellulaires et des formes intracellulaires (Stevens *et al*, 2004).

✓ **Les Salivaria**, dont la transmission se fait par piqûre, soit par passage du parasite dans les glandes salivaires, soit directement par les organes piqueurs de l'insecte. *Trypanosoma brucei* est un parasite extracellulaire chez l'hôte vertébré (Stevens *et al*, 2004). Exemple : *T. brucei* qui comprend trois sous espèces transmises par la mouche tsé-tsé.

Ainsi on distingue :

- ✓ ***T. b. brucei*** parasite du bétail et des carnivores domestiques, responsable d'une trypanosomose appelée Nagana. Utilisé comme modèle expérimental, il permet la réalisation de nombreuses études sans risque de contamination humaine (Poltera *et al*, 1985).
- ✓ ***T. b. gambiense*** est l'agent de la maladie du sommeil sous sa forme chronique en Afrique de l'Ouest et Centrale. Il n'est théoriquement pathogène que pour l'homme, mais il existe des animaux porteurs pouvant jouer le rôle de réservoir du parasite (porcs, moutons...) (Njiokou *et al*, 2006).
- ✓ ***T. b. rhodesiense*** est l'agent d'une anthroponose. Présent en Afrique de l'Est, il est responsable chez l'homme de la forme aiguë de la THA (Welburn *et al*, 2001).

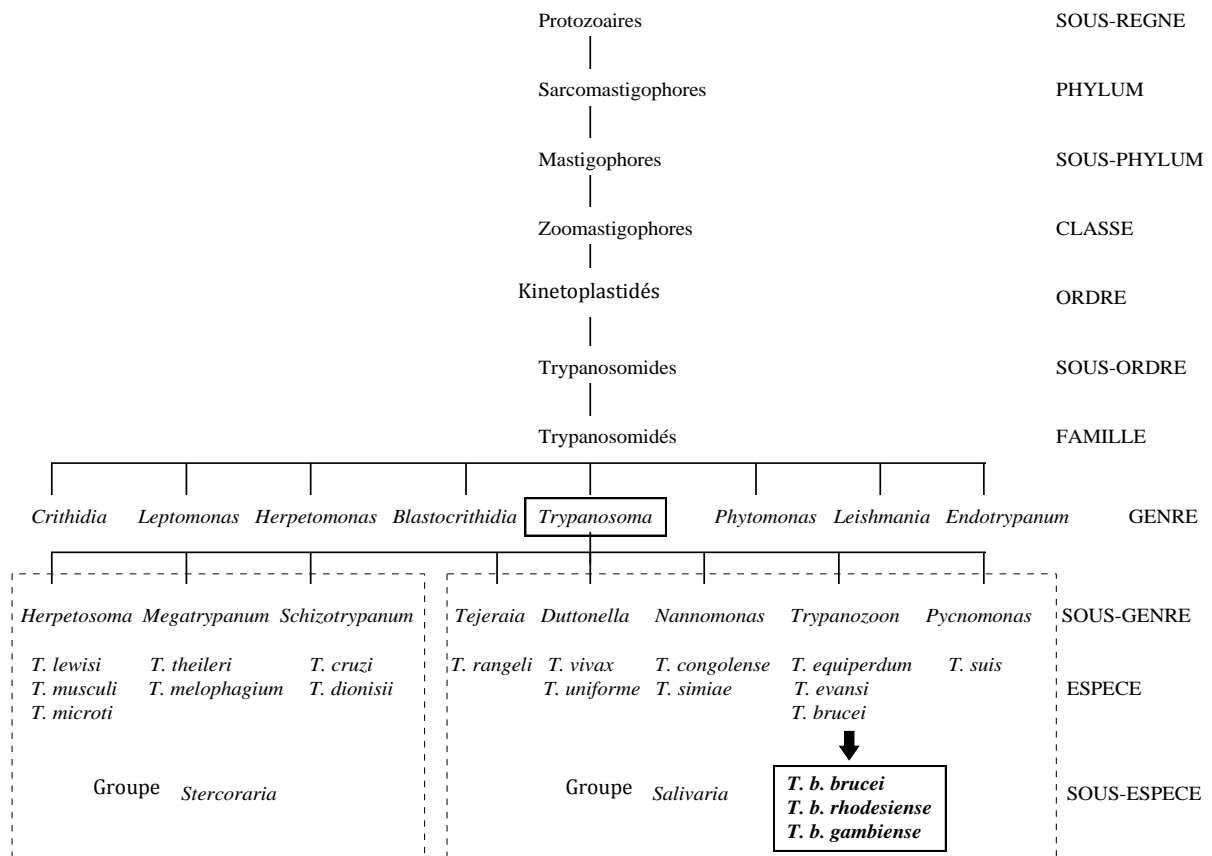


Figure 7 : Classification des trypanosomes (D'après Vickermann, 1985).

Ces 3 sous-espèces sont identiques d'un point de vue morphologique mais leurs formes varient selon le stade du cycle de développement dans lequel elles se trouvent.

L'exemple du cycle de *T. brucei* est présenté sur la figure 8:

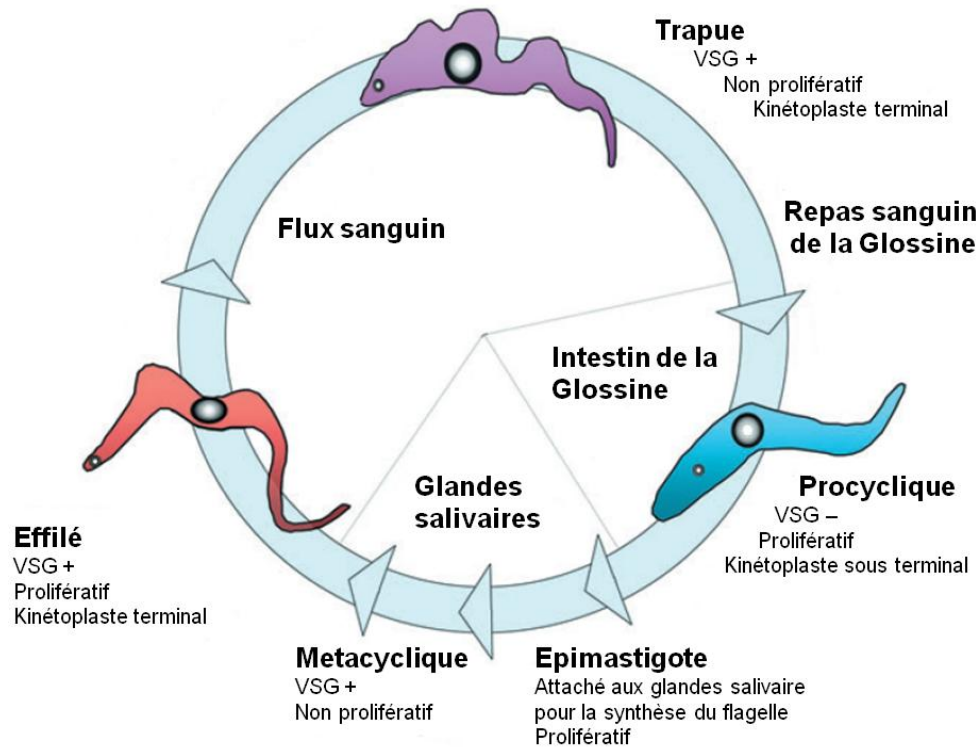


Figure 8: Cycle de développement des trypanosomes. Les flèches représentent les périodes de différenciation dans le cycle du trypanosome (Matthews, 2005).

Les trypanosomes se développent dans le flux sanguin de l'homme sous leur forme effilée métacyclique c'est-à-dire, avec à leur surface des antigènes de « couverture » composés de glycoprotéines appelées VSG (Variant Surface Glycoprotein). Ces VSG participent à l'échappement du parasite à la réponse immunitaire de l'homme. Ces formes présentent un kinétoplaste (génome mitochondrial du parasite) situé au niveau de l'extrémité postérieure de la cellule, et leur activité mitochondriale est relativement réprimée.

Quand la multiplication du nombre de parasite dans le flux sanguin est grande, il y a alors une différenciation du parasite en forme trapue. Ces formes ne se divisent plus afin de pouvoir être transmises à la glossine. Après absorption du repas sanguin par la mouche, les formes procycliques (sans manteau glycoprotéique) apparaissent dans son appareil digestif. Après s'y être installés, les trypanosomes stoppent leurs divisions puis migrent dans les glandes salivaires de la mouche tsé-tsé où ils se fixent, c'est la forme épimastigote. Ces formes évoluent en restant fixées jusqu'à l'élaboration complète du flagelle. Finalement ces formes métacycliques non prolifératives récupèrent leur couche de VSG en vue d'être transmises de nouveau à l'homme (Matthews, 2005).

1.4. Clinique et Physiopathologie de la THA

Les signes cliniques de la THA sont étroitement liés au développement de la réaction immunitaire de l'hôte qui va mettre en jeu des acteurs différents quand l'infection progresse de la peau vers le système lymphatico-sanguin puis vers le SNC (figure 9) où des interactions particulières ont lieu au niveau de la barrière de protection représentée par la BHE. Pour *T. b. gambiense* le temps d'évolution vers le stade nerveux est de plus d'un an (Checchi *et al*, 2008), et pour la forme aiguë due à *T. b. rhodesiense* cette même évolution se fait en 3 semaines (Odiit *et al*, 1997).

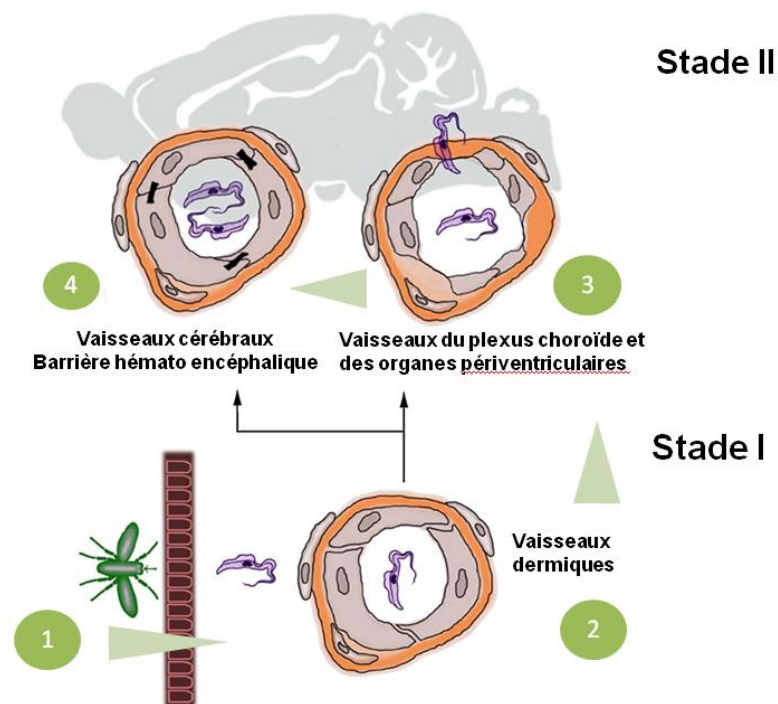


Figure 9 : Migration du trypanosome dans l'organisme. Après la piqûre de glossine (1) il y a une réplification puis une propagation par les vaisseaux hémolympatiques (2). Ils atteignent le cerveau par la circulation sanguine, d'abord par les capillaires fenestrés (3) puis après un processus inflammatoire complexe, passent par les veinules post capillaires avec jonctions serrées (traits noirs). (Kristensson *et al*, 2010).

1.4.1. Stade I ou stade lymphatico-sanguin

Une réaction locale à la piqûre provoque un chancre d'inoculation ou trypanome (Figure 10). Ce chancre apparaît rarement chez *T. b. gambiense* mais est présent dans 19% des cas dus à *T. b. rhodesiense*. Il pourrait permettre un diagnostic précoce de la maladie mais il est rarement rencontré sur les peaux noires.



Figure 10 : Illustration d'un trypanome (Peters *et al*, 1977)

Les symptômes apparaissent de manière très variable entre une et trois semaines après la piqûre infectante. La symptomatologie la plus courante lors d'un stade I est une fièvre intermittente, des céphalées, accompagnées d'arthralgies, des malaises, une apathie, un prurit, des adénopathies lymphatiques et dans une moindre mesure une hépato-splénomégalie. La fièvre est intermittente avec des attaques pouvant durer de un jour à une semaine entrecoupées par des intervalles de quelques jours à un mois ou plus (Duggan *et al*, 1966).

Les épisodes fébriles correspondent à une réaction inflammatoire de type 1 associée à l'activation des cellules macrophagiques 1 et de hautes concentrations d'IFN- γ , de TNF- α , de radicaux libres (NO) et leurs métabolites. Cette réaction peut contrôler l'invasion et la prolifération parasitaire, mais la réponse immunitaire exagérée peut entraîner des lésions tissulaires. Pour contrer cela, l'hôte peut réagir par une réaction immunitaire de type 2, avec une activation des cellules macrophagiques 2 qui vont induire la production d'IL-10 d'IL-4 et d'IL-1 β ayant des propriétés anti-inflammatoires, immunosuppressives, et inhibitrices de la synthèse de NO (Stijemans *et al*, 2007).

1.4.2. Passage de la barrière hémato méningée

Après s'être fixés aux cellules endothéliales de surface, les globules blancs, peuvent sortir des vaisseaux sanguins par ouverture d'une jonction serrée entre les cellules endothéliales (Engelhardt *et al*, 2004). Des études utilisant des préparations de BHE *in vitro* ont suggéré que le parasite pouvait traverser les

cellules endothéliales par un processus similaire et qu'une cystéine protéase, la trypanosome derived cathepsin L-like (ou brucipain) était nécessaire pour cela (Nikolskaia *et al*, 2006).

L'infiltration de cellules inflammatoires à travers la BHE se produit au niveau des veinules post capillaires et non dans les capillaires eux-mêmes (Owens *et al*, 2008). Ces veinules post capillaires sont entourées par un espace péri-vasculaire bordé par la membrane basale endothéliale et une membrane basale parenchymateuse formée de prolongements astrocytaires ou *glia limitans*.

Les étapes permettant le passage des globules blancs dans le parenchyme sont régulées par la composition biochimique de ces deux membranes basales (Owens *et al*, 2008). La première membrane à être franchie est la membrane basale endothéliale qui permet le passage des lymphocytes, uniquement si elle est constituée de laminine- α 4, et non de laminine- α 5. Les lymphocytes qui ont ainsi pu passer cette première barrière vont alors patienter dans l'espace périvasculaire jusqu'à ce que les processus permettant de franchir la *glia limitans* soient initiés. L'invasion des globules blancs à travers la *glia limitans* est l'événement crucial permettant l'apparition de signes de la maladie dans l'encéphalomyélite allergique expérimentale (Owens *et al*, 2008).

La *glia limitans* est ancrée par une sous-unité transmembranaire, la dystroglycane- β au niveau de la fin du pied astrocytaire. Cette sous-unité dystroglycane peut être clivée sélectivement par les MMP-2 et les MMP-9 (Matrix MetalloProteases), lorsqu'elles sont activées pendant l'inflammation. Un tel clivage crée alors une ouverture temporaire et localisée de la *glia limitans* permettant alors le passage des globules blancs dans le parenchyme (Agrawal *et al*, 2006). Chez des souris infectées par un clone utilisé en laboratoire de *T. b. brucei*, le passage de la *glia limitans* par les lymphocytes T et les parasites est facilité par l'IFN- γ (Masocha *et al*, 2004). Chez les souris déficientes pour les gènes codants l'IFN- γ ou pour leurs récepteurs, les trypanosomes sont capturés entre les deux types de membranes basales (Masocha *et al*, 2004).

1.4.3. Stade II ou stade nerveux

Les symptômes les plus flagrants sont des troubles du sommeil et des troubles neuropsychiatriques. Des études somnographiques ont montré que la maladie entraînait une dérégulation du rythme circadien du cycle veille/sommeil et une fragmentation du sommeil (Buguet *et al*, 2001), accompagnée d'une disparition de la sécrétion circadienne de prolactine, de rénine, d'hormone de croissance et de cortisol, seul le cycle de la mélatonine est conservé (Lundkvist *et al*, 2004). D'autres troubles endocriniens, notamment de la thyroïde et des corticosurrénales peuvent se manifester par un hypo ou un hyper fonctionnement, sans pour autant appeler à un traitement spécifique (Blum *et al*, 2007). Ces symptômes sont plus prononcés dans la maladie due à *T. b. rhodesiense* (Reincke *et al*, 1998).

Les signes psychiatriques comme l'irritabilité, la psychose, l'agressivité, ou l'inactivité accompagnée d'apathie peuvent dominer le tableau clinique (Kennedy, 2006). En Europe, des immigrants infectés par la maladie, ont parfois été admis à tort en hôpital psychiatrique (Bédard-Milet *et al*, 2000).

Les signes neurologiques sont variables, avec : des troubles de l'équilibre, des troubles d'élocution, des tremblements, une parésie d'un membre, une rigidité de type Parkinson ainsi que des mouvements anormaux de type choréiques ou athétosiques. De plus, la fréquence et l'intrication de ces signes augmentent avec la durée de la maladie (Blum *et al*, 2005).

1.5. Immunopathologie

1.5.1. Au cours du stade I

La réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle important sur la multiplication du parasite *in vivo*. Toutefois, les variations antigéniques des VSG qui recouvrent presque complètement la surface du parasite rendent inefficace la tentative d'élimination par les anticorps (Vickerman, 1985). En changeant de VSG et en exposant ce nouvel antigène, la population du parasite peut croître rapidement alors que les anticorps dirigés contre ces nouvelles VSG commencent à peine à être produits, et ainsi, le cycle est répété. Environ 10% du génome du trypanosome est utilisé pour l'encodage d'approximativement 1 000 formes de VSG différentes. Le rôle de la réponse immunitaire humorale est donc d'éliminer les trypanosomes qui n'ont pas pu changer leurs VSG.

Dans les tissus, un nouveau contrôle de l'expansion du parasite s'exerce avec l'immunité innée (macrophages, complément) et acquise (lymphocytes mémoires et anticorps) du malade (Mansfield *et al*, 2005). L'activation des macrophages est un élément très important dans cette infection, en effet elle peut être induite par les VSG solubles libérées par les parasites vivants ou les VSG membranaires (Drennan *et al*, 2005).

L'activation des cellules présentatrices d'antigène, c'est-à-dire les cellules dendritiques et les macrophages, est due en partie au Toll-Like Receptor (TLR) 9 et sa molécule intracellulaire associée, MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) (Drennan *et al*, 2005). Elles produisent alors le TNF- α ainsi que tous les radicaux libres et les dérivés nitrés pouvant être toxiques pour le parasite. En outre, les macrophages et cellules dendritiques activés par les trypanosomes sécrètent les IL-12 et IL-18, cytokines pouvant activer à leur tour les lymphocytes T helper de type 1 (Th 1) avec production d'IFN- γ (Mansfield *et al*, 2008).

Les parasites en décomposition peuvent aussi libérer un élément du cytosquelette, la trypanine (ancien Trypanosome Lymphocyte-Trigging Factor ou TLTF) (Hutchings *et al*, 2002). Cette trypanine stimule les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ qui vont sécréter l'IFN- γ (Vaidya *et al*, 1997).

Pendant l'infection, les facteurs immunosuppresseurs sont également libérés (Mansfield *et al*, 2005). Ces facteurs vont non seulement prévenir des possibles dommages infligés aux tissus, mais également permettre aux trypanosomes d'échapper à l'élimination dans les tissus rendus hostiles par la réponse immunitaire. Un de ces facteurs est la PGE2 (prostaglandine E2), libérée par la forme effilée du parasite (Kubata *et al*, 2007).

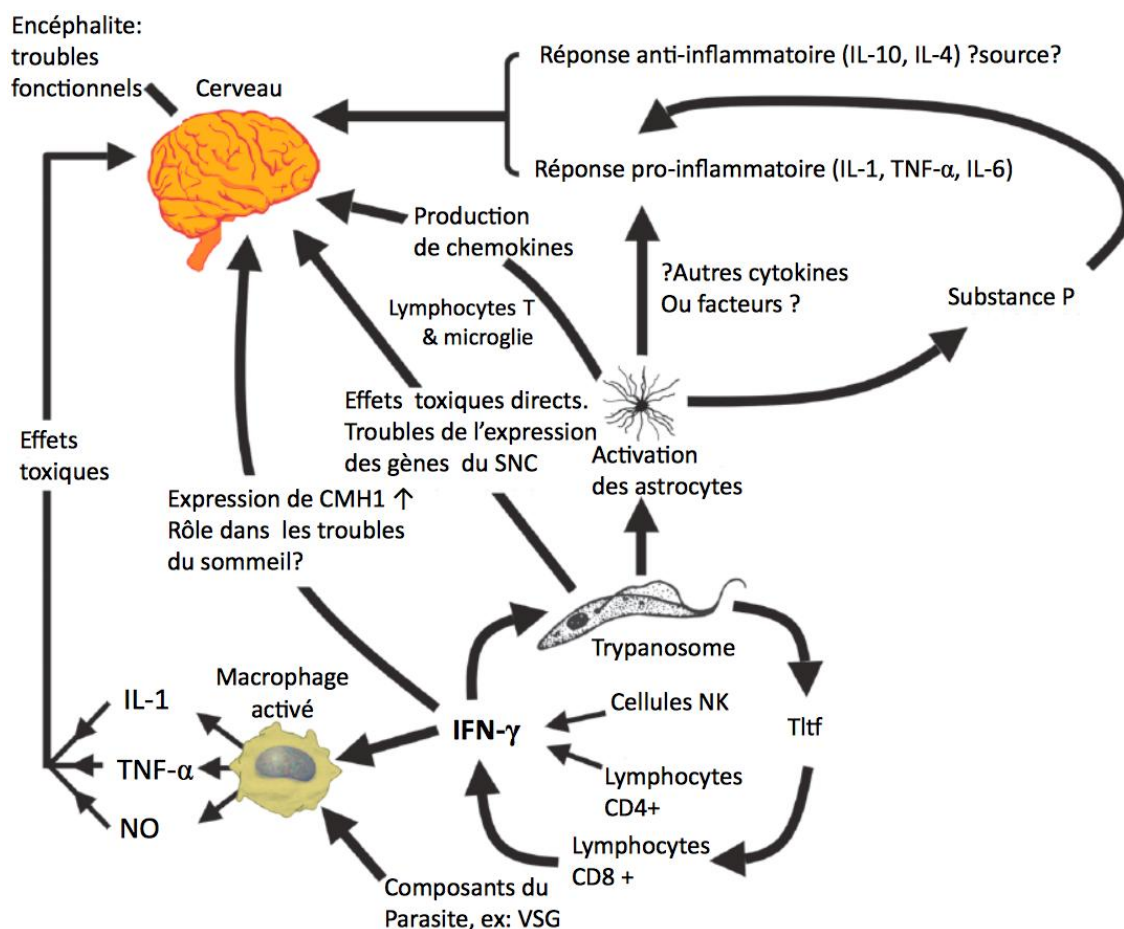


Figure 11 : Les mécanismes immunopathologiques dans la THA

Représentation schématique des mécanismes immunopathologiques conduisant à un dysfonctionnement du SNC lors du stade nerveux de la maladie. D'après Kennedy, (2004). Tlft : trypanosome-derived lymphocyte triggering factor ; NK : cellule Natural Killer; CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

La plupart des interactions complexes (résumées dans la figure 11) entre le trypanosome et les nombreuses réponses du système immunitaire restent encore à découvrir. Une foule de molécules biologiques actives sont libérées pour contrôler l'infection, mais elles peuvent en même temps favoriser la survie du trypanosome extracellulaire dans l'environnement hostile que sont les tissus de l'hôte (Kristensson *et al*, 2010).

Les chémokines quant à elles, sont les médiateurs du recrutement et/ ou de la rétention de cellules de l'inflammation dans les tissus. Elles peuvent être libérées lors d'une infection et/ ou après la reconnaissance par le récepteur de l'immunité innée de molécules microbiennes, ou encore indirectement par des cytokines sécrétées en réponse à l'infection.

La cytokine pro-inflammatoire IFN- γ joue un rôle paradoxal en facilitant la pénétration des lymphocytes T au travers de la BHE dans l'expérimentation de Masocha (2004) sur des souris infectées par *T. b. brucei*. Dans une analyse discriminante de toutes les chémokines et des ARNm (Acide Ribo-Nucléique messenger) de leurs récepteurs chez des souris infectées avec *T. b. brucei*, il a été découvert qu'une accumulation de lymphocytes T et de parasites dans le cerveau était associée en particulier à une augmentation des gènes codant la chémokine IFN- γ -inductible CXCL-10 (anciennement IP-10). Des souris génétiquement modifiées, afin de ne pas exprimer les gènes synthétisant cette chémokine ont montré une diminution de l'invasion du cerveau par les lymphocytes T et les parasites. La chémokine se retrouve dans les astrocytes parenchymateux de la région hypothalamique, chiasma optique et voies optiques (Amin *et al*, 2009).

Les chémokines pro-inflammatoires étant produites au moment de l'infiltration des globules blancs à proximité des organes périventriculaires, il a été supposé que les chémokines, dont l'IFN- γ , se propageaient petit à petit à travers les barrières dans le parenchyme du cerveau (Amin *et al*, 2009). À partir des organes périventriculaires et des plexus choroïdes, les cytokines peuvent se propager respectivement au travers des barrières des tanicytes et de l'épithélium des plexus choroïdes, dans le LCR (Liquide Céphalo Rahidien) d'où l'IFN- γ peut diffuser des cellules épendymaires au parenchyme cérébral. L'expression de CXCL-10 induite par l'IFN- γ dans les astrocytes périvasculaires va ainsi faciliter le passage de la BHE par les lymphocytes T, qui peuvent à leur tour amplifier le processus en sécrétant de nouveau de l'IFN- γ .

Un raisonnement similaire a permis de décrire lors d'une encéphalomyélite allergique, une première vague de lymphocytes (Th-17) entrant dans le cerveau à travers les plexus choroïdes. Cet événement a déclenché une seconde vague de lymphocytes T qui, une fois activés ont traversé l'épithélium des vaisseaux sanguins jusqu'au parenchyme cérébral (Reboldi *et al*, 2009).

1.5.2. Au cours du stade 2

Lorsque le parasite est dans le cerveau, il y a une activation des cellules astrocytaires et microgliales qui ont un rôle essentiel lors de l'inflammation en produisant des cytokines, des chémokine et du NO (Raivich *et al*, 2004). De plus, des études sur les effets de *T. b. brucei* sur des cultures d'astrocytes ont

montré une réponse amenant une dégénération du matériel parasitaire et des cellules astrocytaires entraînant alors un début d'astrogliose (Pentreath *et al*, 1994). Les astrocytes du noyau suprachiasmatique, qui ont été présentés comme l'interface du système immuno-circadien, répondent *in vitro*, aux Lipo-PolySaccharides (LPS) et également au TNF- α et l'IL-1 β par une augmentation de l'expression d'NF- κ B (Nuclear factor κ B) qui a un rôle important dans l'inflammation (Leone *et al*, 2006). Les récepteurs au TNF- α , à l'IFN- γ et aux Suppressors Of Cytokine Signaling (SOCS) 1 et 3 (agents essentiels dans la régulation des cytokines) sont exprimés dans le SNC du rongeur, dont certains présentent des troubles du rythme circadien (Leone *et al*, 2006).

La durée et l'intensité de l'expression des cytokines sont régulées à plusieurs niveaux. Les différents mécanismes proposés pour initier une réponse sont : *i*) la concentration de base en cytokines *ii*) la régulation de l'expression des récepteurs de surface cellulaire *iii*) et les SOCS intracellulaires (Rakesh *et al*, 2005). Les cytokines peuvent toucher le fonctionnement d'un neurone en augmentant la libération de signal et également en entraînant une baisse des processus dépendants de la transcription, ce qui peut entraîner une réaction en chaîne impliquant des milliers de transcrits de gènes. Les effets peuvent survenir au niveau de la membrane du neurone et/ou de la synapse, ainsi qu'au niveau de l'interaction neurone/cellules gliales. Le TNF- α et l'IFN- γ sont tous deux des inducteurs potentiels des transcrits d'iNOS (inductible Nitric Oxide Synthase) et de la production de NO qui joue un rôle dans la croissance de *T. brucei* et également dans la survenue des troubles nerveux (Kristensson *et al*, 2010).

1.6. Diagnostic

Le diagnostic de la maladie et du stade de la THA ne se fait que par des examens de laboratoire, en effet les caractéristiques cliniques de la maladie ne sont pas suffisamment spécifiques (Chappuis *et al*, 2005). Une approche en trois étapes est utilisée dans les programmes de contrôle, avec pour chacun des patients, un dépistage, un diagnostic, une confirmation et un classement dans le bon stade de la maladie.

Le test d'agglutination sur carte pour (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis ou CATT) développé dans les années 70, peut être fait à partir de sérum, ou de sang capillaire obtenu par une petite piqûre au doigt, ou bien de sang imprégné sur du papier filtre. Le CATT est un test sérologique pratique qui permet le dépistage de centaines de personnes au quotidien. Selon les auteurs, ce test est sensible à 87-98% et spécifique à 93-95% (Penchenier *et al*, 2003 ; Jamonneau *et al*, 2000). Il est le mieux adapté au terrain et le plus efficace. A ce titre, il est très utilisé pour le dépistage de masse dans les pays endémiques (Robays *et al*, 2004). Toutefois, le test étant utilisé dans les populations où la prévalence de la THA est

généralement inférieure à 5%, la valeur prédictive positive d'un CATT positif reste trop faible pour une confirmation de la maladie. D'autres tests sérologiques plus sensibles comme l'immunofluorescence ou l'ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays) ont été utilisés dans les pays non endémiques pour dépister des personnes avec des symptômes typiques ou ayant déjà été exposées (Lejon *et al*, 1998).

L'examen microscopique de la lymphe de la ponction ganglionnaire, et/ou du sang est nécessaire pour une confirmation parasitologique. Le délai entre la ponction et la recherche microscopique doit être le plus court possible afin d'éviter toute lyse des trypanosomes. La sensibilité de la palpation des ganglions lymphatiques et de l'aspiration varie de 40 à 80 % en fonction de la souche du parasite, du stade de la maladie (test plus sensible pendant le premier stade) et selon la prévalence locale d'autres maladies entraînant la même symptomatologie (Simarro *et al*, 2003).

Les examens de frottis minces ou de gouttes épaisses ayant une sensibilité très faible, il faut alors utiliser les méthodes de concentrations comme la centrifugation en tubes à hématocrite (Woo, 1970), la filtration sur mini colonne échangeuse d'ions (miniature Anion Exchange Centrifugation Technique, m-AECT) (Lumsden *et al*, 1979) et le QBC (Quantitative Buffy Coat technique) (Ancelle *et al*, 1997). La détection des acides nucléiques du parasite par Polymerase Chain Reaction (PCR) pourrait s'avérer être plus sensible mais les tests existants ont encore besoin d'une standardisation et d'une validation clinique (Chappuis *et al*, 2005).

Certains chercheurs recommandent dans les pays avec un fort taux de prévalence, le traitement des personnes avec un titre CATT élevé ($\geq 1:16$) même si l'examen parasitologique est négatif, notamment au cas où les méthodes de détection sanguine les plus sensibles ne sont pas utilisées (Chappuis *et al*, 2004).

Le traitement étant différent selon les deux stades de la maladie, ils doivent être déterminés par l'examen du LCR après une PL (Ponction Lombaire). Selon les recommandations de l'OMS, le stade nerveux se définit par la découverte dans le LCR : *i*) de plus de 5 globules blancs par μL *ii*) d'une protéinorachie élevée (>370 mg/L) et/ou *iii*) de trypanosomes (OMS, 1998). La détermination de la teneur en protéines du LCR a été presque totalement abandonnée parce qu'elle nécessite un matériel sophistiqué, des réactifs instables à la chaleur et qu'il s'agit d'une analyse donnant des informations supplémentaires limitées (Lejon *et al*, 2003). Sur le terrain, le comptage des 5 cellules par μL de LCR est le seuil le plus largement utilisé. De plus, l'augmentation des concentrations d'IgM dans le LCR, due à la synthèse intrathécale est un marqueur précoce et spécifique de l'invasion du SNC (Bisser *et al*, 2002).

La recherche et le développement des méthodes de diagnostic de la maladie et de ses stades, ont été relancés, notamment grâce à l'initiative lancée en 2006 par FIND (Steverding, 2006). La recherche actuelle se concentre sur plusieurs aspects: *i*) les antigènes recombinants ou natifs qui pourraient être utilisés pour

développer un test sérologique amélioré. *ii*) les méthodes pour détecter un antigène de parasite dans le sang ou le LCR. *iii*) les empreintes digitales protéomiques. *iv*) les méthodes de PCR simplifiée telle que l'amplification isotherme en boucle, ou l'oligochromatographie. *v*) les nouveaux marqueurs de stades de la maladie, dans le sang ou le LCR (Papadopoulos *et al*, 2004 ; Deborggraeve *et al*, 2006 ; Hainard *et al*, 2009).

1.7. Traitement

1.7.1. Principales molécules utilisées dans la THA

1.7.1.1. Stade I

Pentamidine, (Pentacarinat®) (structure figure 12) : Ce médicament a été découvert en 1941, et il est généralement bien toléré. On l'utilise depuis cette date pour traiter le stade I de la trypanosomose due à *T. b. gambiense*. La Pentamidine est une diamidine aromatique.

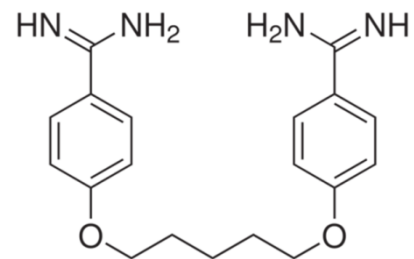


Figure 12 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA, la Pentamidine

Suramine, (Moranyl®) (structure figure 13) : La Suramine appartient à la famille des naphtylamines sulfonées. Ce médicament a été découvert en 1921. La molécule se dégrade au contact de l'air et doit être immédiatement injectée après sa dilution. Elle est efficace contre *T. b. gambiense*, cependant elle est évitée en Afrique de l'Ouest et Centrale, où sévit l'onchocercose (*Onchocerca volvulus*). En effet, la Suramine est alors efficace contre les deux parasites, mais la mort de l'onchocercue produit une réaction allergique de type choc anaphylactique (Brun *et al*, 2010). La Suramine n'est pas utilisée pour le stade II de la maladie de part sa masse molaire élevée et sa polarité l'empêchant de franchir la BHE à pH physiologique.

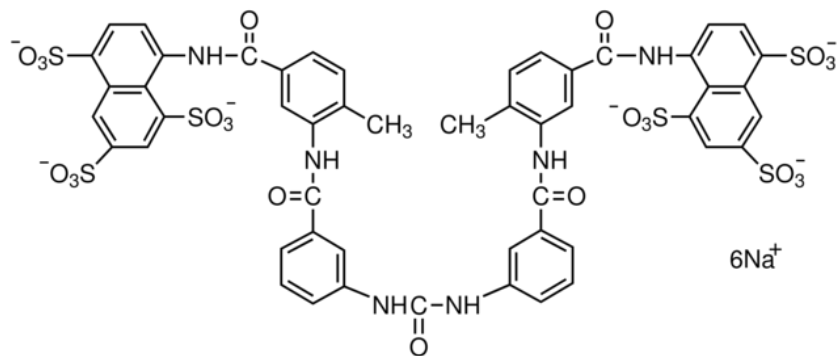


Figure 13 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA, la Suramine

1.7.1.2. Stade II

Mélarsozol (Arsobal®) (structure figure 14) : C'est une molécule découverte en 1949. Il est utilisé contre la phase nerveuse due aux deux types de parasite. Ce médicament est un dérivé de l'Arsec et a donc de très nombreux effets indésirables dont le plus grave est, dans 10% des cas traités, une encéphalopathie, qui peut s'avérer mortelle pour la moitié d'entre eux (Pépin *et al*, 1994). Malheureusement des résistances ont déjà été observées (Bisser *et al*, 2007) jusqu'à 30% de patients infectés par *T. b gambiense* ne répondent pas au Mélarsozol (Brun *et al*, 2001).

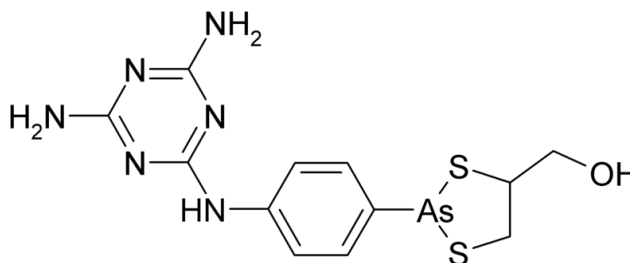


Figure 14 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA, le Mélarsozol

α -Difluoromethylornithine (DFMO) ou Eflornithine (structure figure 15) : C'est la plus récente des molécules actives sur cette maladie. Elle agit en inhibant l'Ornithine Décarboxylase (ODC). En effet, depuis 1990, elle offre une alternative au traitement par Mélarsozol dans le cas d'une infection à *T. b. gambiense* uniquement. On l'utilise en perfusion intraveineuse de plus de 30 minutes à raison de 100 mg/kg à 6 h d'intervalle pendant 14 jours. Les principaux effets indésirables sont ceux des anticancéreux (voir tableau 1). Dans certaines régions 6 à 8 % des personnes traitées n'expriment aucun bénéfice thérapeutique au traitement par Eflornithine (Priotto *et al*, 2008).

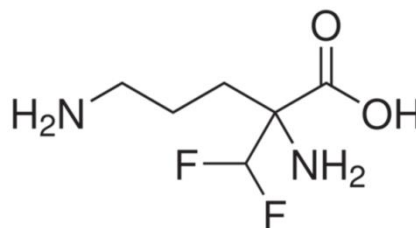


Figure 15 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA, l'Eflornithine

Eflornithine et Nifurtimox (structure figure 16) : Cette combinaison a été démontrée comme étant plus efficace que l'Eflornithine en monothérapie pour le stade nerveux de la maladie et a permis de réduire la durée du traitement dans des essais cliniques (Priotto *et al*, 2009).

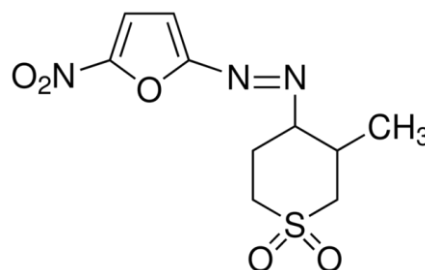


Figure 16 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA : le Nifurtimox

Les dosages et effets indésirables de ces médicaments de la THA sont présentés dans le tableau 1 page suivante.

Tableau 1: Médicaments utilisés contre la maladie du sommeil, dosages et effets indésirables ; d'après Kappagoda *et al*, (2011), Fries *et al*, (2003), Brun *et al*, (2010), Kennedy, (2004).

Molécules	Utilisation	Dosages adultes	Dosages enfants	Effets indésirables
Pentamidine	Stade 1 <i>T. b. gambiense</i>	4 mg/kg/jour IM ; 7-10 jours	Même dosage que pour les adultes	Hypotension (perfusion IV), douleur au site d'injection, diarrhées, nausées, vomissements, hyper et hypoglycémie, plus rarement ; hépatite, pancréatite, leucopénie, abcès, néphro et cardiotoxicité, choc anaphylactique, hyperkaliémie
Suramine	Stade 1 <i>T. b. rhodesiense</i> et <i>T. b. gambiense</i>	100-200 mg (en dose test) IV ; puis 1 g en IV aux jours 1, 3, 7, 14, 21	20 mg/kg, aux jours 1, 3, 7, 14, 21	Éruption cutanée (incluant une dermatite exfoliative), vomissements, prurit, urticaire, neuropathie périphérique, paresthésies, hyperesthésie des mains et des pieds, photophobie, plus rarement réaction de choc (1 sur 20 000 doses), Néphrotoxicité, myélosuppression, et une atrophie optique
Melarsoprol	Stade 2 <i>T. b. gambiense</i> et <i>T. b. rhodesiense</i>	2,2 mg/kg/jour en IV pendant 10 jours 3 × 3,6 mg/kg/jour tous les 7 jours ; maxi 180 mg/ prise	0,36 mg/kg en IV tout les 1 à 5 jours pour un total de 9 à 10 doses en un mois sans dépasser 18 à 25 mg/kg	Vomissements, hypertension, néphrotoxicité, hépatite, lésions myocardique, réactions cutanées (prurit, éruptions maculo-papuleuses), neuropathies périphériques motrices (paralyse) et sensorielles (paresthésies), fièvre, thrombophlébite, arythmies cardiaques, thrombopénie, encéphalopathie réactive (souvent mortelle) diminuée par l'administration concomitante de corticostéroïdes. Contre indiqué aux déficients en G6PD
Eflornithine	Stade 2 <i>T. b. gambiense</i>	100 mg/kg en IV (30 min) toutes les 6 h pendant 14 jours		Diarrhée, nausées, vomissements, fièvre, convulsions, neuropathie périphérique, hypertension, éruption cutanée, alopecie, myélosuppression, anémie, leucopénies, thrombocytopenie, possibles convulsions
Eflornithine et Nifurtimox	Stade 2 <i>T. b. gambiense</i>	200 mg/kg en IV toutes les 12 h pendant 7 jours 5 mg/kg PO 3 fois par jour pendant 10 jours		Nausées, vomissements, anorexie, douleurs abdominales, insomnie, neuropathie périphérique, hépatite (éviter l'alcool)

1.7.2. Mécanismes d'action des principaux médicaments de la THA

La Pentamidine

La Pentamidine (structure figure 12) est une diamidine aromatique qui a tout d'abord été synthétisée puis testée en tant qu'agent hypoglycémiant en 1937. Par la suite son activité anti protozoaire a été découverte puis utilisée pour traiter la trypanosomose en 1941. La Pentamidine est actuellement commercialisée sous forme de sel de Di-lsethionate (Pentam[®] 300, Nebupent[®], Pentacarinat[®]) et de Dimesylate (Lomidine[®]). Elle est active dans la phase précoce de la maladie due à *T. b. gambiense* et également utilisée pour lutter contre la forme antimoine résistant de *Leishmania donovani* (Neal *et al*, 1987) et *Pneumocystis carinii* chez les patients intolérants face au traitement habituel, sulfaméthoxazole-triméthoprime (Damper *et al*, 1976).

La Pentamidine sous forme de sel Di-lsethionate est très soluble dans l'eau et relativement instable en solution. Elle doit être dispensée par voie intraveineuse ou intramusculaire et préparée de façon extemporanée. Le Diminazène (voir figure 17), ou Berenil[®] est également une diamidine mais plus toxique et réservé seulement aux usages vétérinaires. Bien que déjà utilisé pour le traitement de la THA, son innocuité et son efficacité pour l'usage humain n'ont pas encore été correctement évaluées (Peregrine *et al*, 1993).

Au pH physiologique, les diamidines sont quasiment toutes saturées en hydrogène au niveau de chacun des groupes amidines, ce qui entraîne une mauvaise absorption après une prise par voie orale, et également un faible passage de la BHE (Fries *et al*, 2003). Cette faible pénétration dans le SNC rend la molécule inefficace pour traiter le stade neurologique de la maladie.

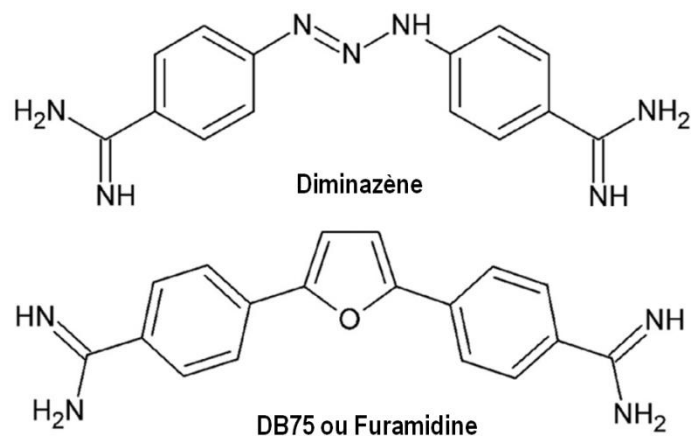


Figure 17: Structure chimique du Diminazène et du DB75

L'activité de la Pentamidine et des autres diamidines dépend pour beaucoup de la capacité d'assimilation de ces molécules par les parasites (Sands *et al*, 1985 ; Carter *et al*, 1995). Un des chemins d'entrée de la Pentamidine a été identifié comme étant le transporteur de purines du type 2 (P2) qui transporte l'adénine et l'adénosine dans les cellules (Carter *et al*, 1995). Le Méarsoprol, le DB75

(ou Furamide ; voir figure 17) ainsi que le Mégazol utiliseraient ces mêmes transporteurs (Barret *et al*, 2000 ; Lanteri *et al*, 2006). De plus, De Koning et Jarvis ont identifié au moins un transporteur de plus pour la Pentamidine chez *T. b. brucei* (De Koning *et al*, 2001). Les molécules prises en charge par le transporteur P2 ont toutes une unité structurale en commun, représentée dans la figure 18, reconnue par le transporteur.

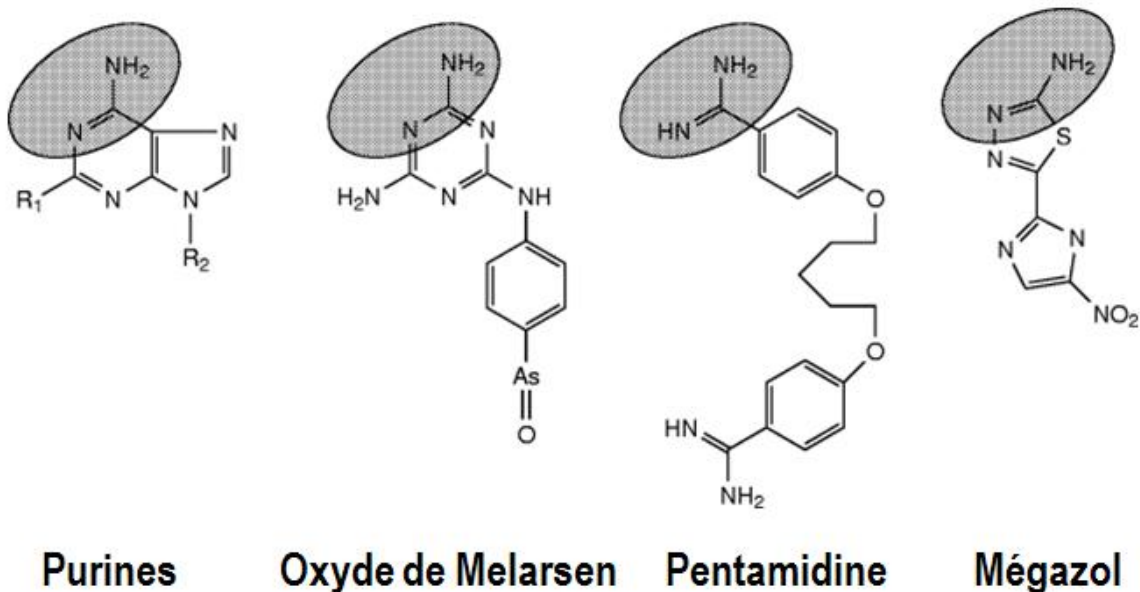


Figure 18 : Molécules utilisant le transporteur P2 pour une internalisation active dans le trypanosome.
L'unité structurale commune à chacun est entourée en gris. (Fries *et al*, 2003).

Une résistance croisée (cross-resistance) entre tous ces agents, intervient avec la diminution de l'expression des transporteurs P2 (Barret *et al*, 1999 ; Mäser *et al*, 1999). Certaines souches de *T. brucei* résistantes à la Pentamidine ont diminué leur aptitude à importer les diamidines (De Koning, 2001), alors que d'autres non (Berger *et al*, 1995), cela démontre que plusieurs types de mécanismes de résistance sont impliqués.

Le mécanisme précis permettant l'action trypanocide de la Pentamidine reste indéterminé. Certains effets sur la biochimie du trypanosome ont été démontrés *in vitro*, mais aucun n'est avec certitude la cause majeure de la mort du parasite. La Pentamidine se présente à des concentrations de l'ordre du milli-mole dans les cellules où elle se lie à toutes sortes de composants cellulaires chargés négativement, tels que ; ADN (Acide Désoxyribonucléique), ARN (Acide Ribo-Nucléique), phospholipides, et de nombreuses enzymes (Kapusnik *et al*, 1987 ; Bailly *et al*, 1994 ; Kappagoda *et al*, 2011). Kapusnik et Mills, et Bailly *et al*, ont rapporté la fixation de la Pentamidine aux acides nucléiques

et Edwards *et al*, (1992) ont co-cristallisé la Pentamidine fixée au dodecanucléotide d(CGCGAATFCGCG)₂.

La Pentamidine peut être trouvée sous forme liée transversalement, aux azotes 3 des molécules d'adénines de la région 5'-AATT du petit sillon du double brin de l'ADN. La Pentamidine est connue pour se lier préférentiellement au petit sillon de l'ADN du kinétoplaste chez *T. brucei*. Cela entraîne alors une perturbation de l'ADN du kinétoplaste et génère des cellules non fonctionnelles (Delain *et al*, 1971). Shapiro et Englund ont démontré que la Pentamidine à la concentration de 5 µM entraînait un clivage de l'ADN circulaire du kinétoplaste en créant ainsi un ADN linéaire comme le ferait un inhibiteur de topoisomérase II (Shapiro *et al*, 1990). Cependant, le fait que des trypanosomes aux kinétoplastes non fonctionnels puissent survivre chez l'hôte vertébré montre l'incertitude qui réside dans l'hypothèse de ce mécanisme.

La Pentamidine a encore d'autres actions sur les trypanosomes. Berger *et al*, ont traité des rats avec la Pentamidine puis ont infecté ces derniers avec *T. b. brucei* (Berger *et al*, 1993). Après 4 h, ils ont trouvé chez le trypanosome, en comparant aux normales, une teneur en lysine multipliée par 13, et par 2,5 pour l'arginine. La cause de cet effet n'a pas été élucidée.

Benaim *et al*, ont démontré que la Pentamidine avait un effet inhibiteur sur la (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase du trypanosome (Benaim *et al*, 1993). Une autre enzyme inhibée *in vitro* par la Pentamidine, est la S-adenosyl-L-méthionine decarboxylase (AdoMetDC) une enzyme clé dans la biosynthèse des polyamines (Bitonti *et al*, 1986). Par ailleurs, les mutants non producteurs et les surproducteurs de AdoMetDC de *L. donovani* ne montrent aucune altérations dans leurs sensibilités à la Pentamidine et au Bérénil, éliminant l'AdoMetDC comme cible majeur de ces médicaments (Roberts *et al*, 2002).

La Pentamide a été suspectée d'inhiber l'épissage *in vitro* d'un intron de groupe I dans les transcriptions des gènes d'ARN ribosomal de *P. Carinii* (Liu *et al*, 1994). Il est possible que l'ARN synthétisé par les trypanosomes soit touché de façon similaire par la Pentamidine.

La Suramine

La Suramine (sel de sodium) représentée dans la figure 13, aussi connue sous le nom de Bayer 205 est une Naphthylamine sulfoné polyanionique colorante (MW 1429), chimiquement proche du Bleu et du Rouge de Trypan, qui comme leurs noms l'indiquent possèdent également une activité anti-trypanosome. La Suramine est apparue dans les années 1920 et elle reste la molécule de choix pour le traitement du stade I des infections à *T. b. rhodesiense*. Cette molécule se dilue très bien dans l'eau et doit être administrée par injection intra veineuse. La Suramine est instable en solution exposée à l'air

libre, elle doit donc être dissoute au dernier moment avant l'injection. L'inefficacité de la Suramine contre le stade neurologique de la maladie est prévisible car il s'agit d'une molécule hautement polaire ne pouvant donc pas traverser la BHE de façon significative.

La toxicité sélective de la Suramine peut s'expliquer par la capacité des trypanosomes à l'accumuler. Fairlamb et Bowman (1980) ont démontré qu'en présence de protéines sériques, les trypanosomes absorbaient la Suramine grâce à des récepteurs effectuant une endocytose à un taux 18 fois plus élevé que dans une endocytose d'un fluide sans protéine. De plus, il semble que les lipoprotéines de faible densité (LDL) soient les protéines de liaisons les plus importantes pour l'endocytose de la Suramine (Vansterkenburg *et al*, 1993). Cependant, une étude de Pal *et al*, (2002) a suggéré que l'absorption de Suramine n'est pas médiée par un récepteur des LDL, mais par un autre récepteur dont le mécanisme reste à identifier.

Fairlamb *et al*, ont découvert que chez des rats infectés par *T. brucei*, puis traités par cette molécule, la Suramine plasmatique atteint une concentration de 100 μM , la Suramine absorbée par *T. brucei* s'élève à 0,5 nmol/mg de protéine. Avec une concentration protéique cellulaire dans *T. brucei* d'environ 200 mg/mL (Chello *et al*, 1972), la concentration cellulaire moyenne en Suramine est estimée à environ 100 μM , ce qui est l'équivalent de la concentration exogène. Or, si la Suramine devait être retenue par endocytose dans les compartiments, alors la concentration locale serait bien plus élevée (Fairlamb *et al*, 1977).

Une fois que la Suramine a pénétré dans le trypanosome, le mécanisme d'action trypanocide demeure incertain. La Suramine a une activité inhibitrice contre de nombreuses enzymes trypanosomiales et de multiples mécanismes sont probablement impliqués dans son effet thérapeutique. Chez *T. brucei*, Jaffe *et al*, (1972) ont démontré que la Suramine avait une propriété inhibitrice de dihydrofolate réductase, mais également de la thymidine kinase (Chello *et al*, 1972 ; Morty *et al*, 1998), impliquant dans l'activité de la Suramine, l'inhibition de la sérine oligopeptidase cytosolique du trypanosome. Elle est également un puissant inhibiteur des enzymes de la glycolyse chez *T. brucei* (Willson *et al*, 1993 ; Trinquier *et al*, 1995). Cependant les enzymes de la glycolyse sont à l'intérieur d'un organite lié à la membrane, le glycosome, et il demeure peu probable que la Suramine qui est très polaire puisse pénétrer la membrane de cet organite pour atteindre ces enzymes (Opperdoes *et al*, 1984). L'inhibition des enzymes glycolytiques devrait entraîner une mort et une lyse rapide des trypanosomes car ils sont totalement dépendants de la glycolyse pour leur production énergétique. Or il a été montré que les trypanosomes exposés à la Suramine mouraient lentement sur une période de plusieurs jours (Clarkson *et al*, 1976 ; Fairlamb *et al*, 1980).

La synergie marquée entre difluorométhylornithine (éflornithine) et la Suramine pourrait impliquer le métabolisme des polyamines dans son mode d'action (Bacchi *et al*, 1994 ;Clarkson *et al*, 1984). Toutefois, aucune explication biochimique satisfaisante n'a été apportée pour expliquer cet effet. Le fait qu'aucune résistance importante à la Suramine n'ait jamais été rapportée après 80 années d'utilisation va dans le sens d'un médicament ayant plusieurs sites et mécanismes d'actions.

La Suramine a démontré des propriétés inhibitrices de la reverse transcriptase du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) *in vitro* (Take *et al*, 1989), mais il lui manque une action antivirale *in vivo*. A haute dose, elle a également montré une activité antiproliférative et a ainsi été testée contre de nombreuses tumeurs métastatiques (Barret *et al*, 2000). Sa seule autre utilisation dans le domaine médical, utilise ses propriétés anti-filaires dans le traitement de l'onchocercose mais le mécanisme d'action contre le vers adulte n'est pas encore élucidé.

La Suramine se lie aux protéines à 99,7% après une injection intra veineuse de 1 gramme. Les fortes liaisons qui unissent les protéines à la Suramine seraient la cause de sa longue demi-vie (90 jours) (Pépin *et al*, 1994). La Suramine ne subit qu'une faible métabolisation et 80% du médicament est éliminé par clairance rénale. La longue demi-vie de la Suramine lui permet également une utilisation prophylactique.

Le Mélarsoprol

Le Mélarsoprol (représenté par la figure 14) qui a pour noms commerciaux : Mel B[®], Arsobal[®], associe un dérivé organique de l'Arsenic, l'oxyde de Melarsen, à un chélateur de métaux lourds, le 2,3-dimercaptopropanol (Ericsson *et al*, 1997). Le Mélarsoprol a été présenté comme agent anti-trypanosome en 1949. Il est insoluble dans l'eau il est donc injecté dans une solution de propylène glycol à 3,6 % avec utilisation d'une seringue en verre. Lors de son arrivée sur le marché, il était le seul médicament actif contre le second stade de la THA due à *T. b. gambiense* ou *T. b. rhodesiense*. Mais, les deux sous-espèces de trypanosomes ont développé des résistances au Mélarsoprol, privilégiant ainsi l'utilisation de l'Eflornithine pour le second stade de l'infection à *T. b. gambiense*.

Le Mélarsoprol traverse suffisamment la BHE pour éliminer les parasites présents dans le SNC. Le Mélarsoprol est un précurseur médicamenteux, en effet, après l'administration au patient, il se transforme en oxyde de Melarsen qui possède une demi-vie de 30 minutes. L'oxyde de Melarsen disparaît assez rapidement du sérum ($t_{1/2} = 3,8$ h) et, après 24h, aucun composé arsenical ne peut être détecté par chromatographie liquide haute performance ou spectroscopie d'absorption atomique (Keiser *et al*, 2000). Il a été rapporté que l'excrétion du Mélarsoprol chez le rat se faisait principalement par la

bile sous forme glucuronée ou métabolisé en un conjugué diglutathione-Melarsen (Gregus *et al*, 2000). L'oxyde de Melarsen se lie rapidement et réversiblement aux protéines sériques (apparemment par des complexes non identifiés Protéine-S-As ou Protéine-N-As) ce qui forme ainsi une sorte de réservoir d'où les arsenicaux mélaminophényl sont relargués avec une demi-vie de 35 h dans le sérum et de 120 h dans le LCR. Les arsenicaux mélaminophényls trypanocides demeurent dans le sérum et les autres tissus et sont ainsi détectables par dosage.

Les transporteurs de purines P2 du trypanosome entraînent une sélection et une concentration de quantités infimes de Mélarsoprol libre ou d'oxyde de Melarsen ce qui est important pour une toxicité sélective (Carter *et al*, 1993).

Résumé du mécanisme d'action du Mélarsoprol figure 19 (Fries *et al*, 2003).

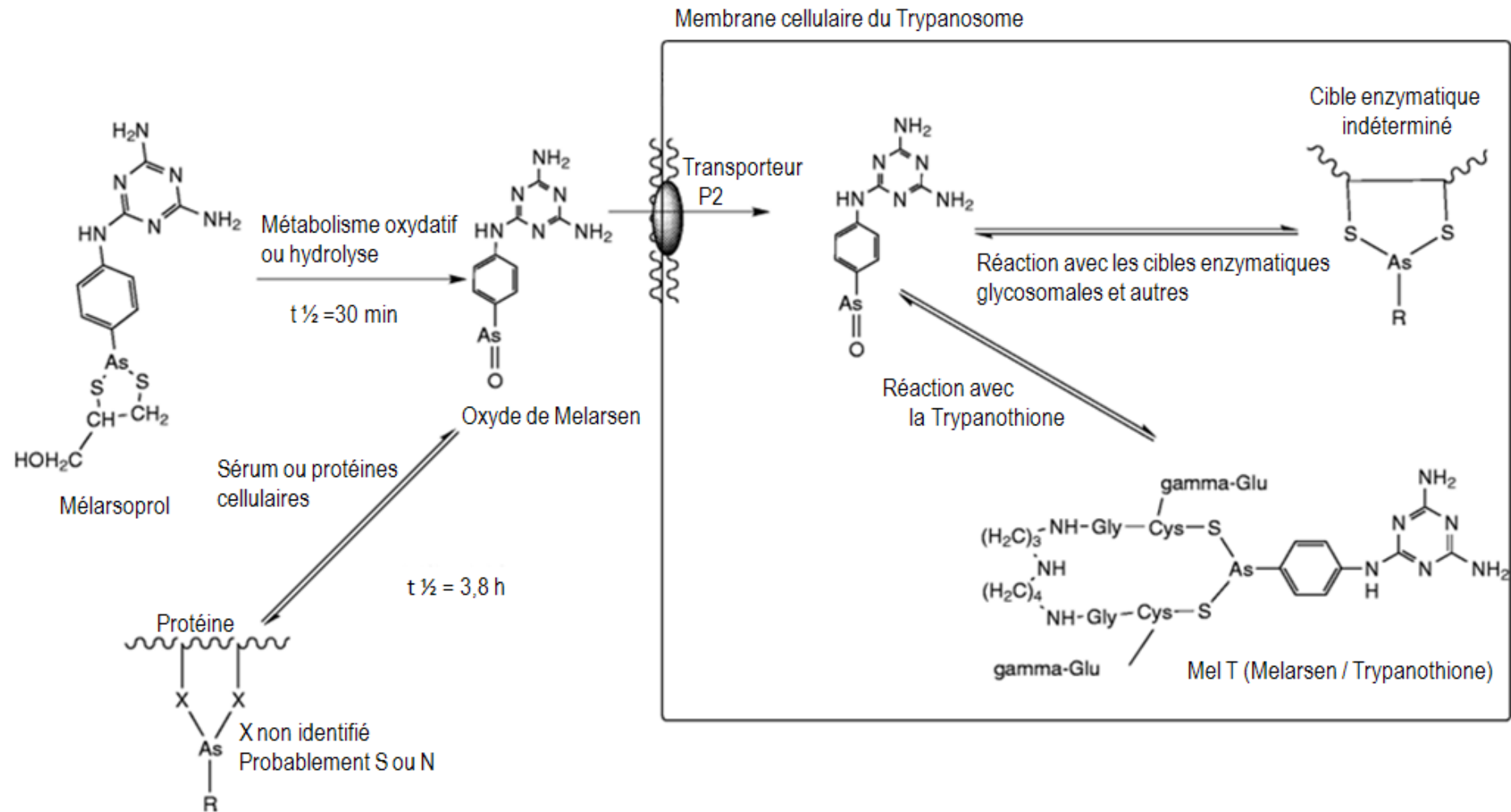


Figure 19 : Mécanisme d'action du Méarsoprol d'après (Fries *et al*, 2003)

La controverse qui entoure le mode d'action du Mélarsozol concerne l'identification du complexe « protéine-arsénicaux » dans le trypanosome. En effet ce complexe est important de part son activité trypanocide. Historiquement, l'hypothèse dominante concernant le mécanisme d'action a été le blocage des enzymes essentielles à la glycolyse chez les trypanosomes sous leur forme effilée (courant sanguin) (Flynn *et al*, 1974).

D'après Van Schaftingen *et al*, (1987) le blocage des enzymes de la glycolyse est le résultat de l'inhibition de la pyruvate kinase qui entraîne une accumulation de phosphoenolpyruvate dans les cellules en suspensions traitées. En fait, cette inhibition aurait lieu en amont, à cause de l'épuisement de fructose-2,6-bisphosphate un puissant activateur du pyruvate kinase. L'oxyde de Melarsen a montré un pouvoir inhibiteur sur la 6-phosphofructo-2-kinase (PFK 2) ($K_i < 1 \mu\text{M}$; K_i = la constante de dissociation, ou d'inhibition, indiquant la concentration nécessaire pour inhiber l'enzyme) et sur la fructose-2,6-bisphosphatase ($\text{Fru}(2,6)\text{P}_2$; $K_i = 2 \mu\text{M}$) entraînant ainsi un appauvrissement en fructose-2,6-bisphosphate (l'activateur de la pyruvate kinase qui est alors inhibé). Toutefois les effets lytiques de ce médicament ont été observés avant l'épuisement de la $\text{Fru}(2,6)\text{P}_2$ ce qui faisait dire aux auteurs que l'inhibition de la glycolyse n'était pas la cause, mais plutôt la conséquence de la lyse (Van Schaftingen *et al*, 1987).

Il a été publié que l'oxyde de Melarsen ou Mélarsozol formait avec le Trypanothione (bis(glutathionyl)spermidine) un adduit, le Mel-T (pour Melarsen / Trypanothione), or le Trypanothione est une molécule essentielle pour l'homéostasie redox du trypanosome (Fairlamb *et al*, 1989). Cet adduit ainsi formé inhiberait la Trypanothione réductase ($K_i = 17,2 \mu\text{M}$) de *T. b. brucei* une enzyme clé permettant de maintenir le Trypanothione sous sa forme réduite (Cunningham *et al*, 1994 ; Loiseau *et al*, 2000). La combinaison de l'appauvrissement en Trypanothione et de l'inhibition de la Trypanothione réductase semble être suffisante pour tuer le trypanosome.

L'oxyde de Melarsen forme également facilement des complexes avec toutes sortes d'enzymes contenant des dithiols et des acides lipoïques (Johnstone, 1963). En plus des complexes Arsenic-protéine décrits précédemment, le Melarsen forme des complexes stables avec la dihydrolipoamide déshydrogénase et de nombreuses protéines dans lesquels des résidus cystéines sont très proches les un les autres. Ce médicament peut donc être un inhibiteur non spécifique de nombreuses enzymes, ce qui peut expliquer l'impressionnante liste d'effets secondaires toxiques qu'il entraîne.

Le Mélarsozol entraîne des encéphalopathies réactives chez 5 à 10 % des patients traités, avec une issue fatale chez 10 à 50 % d'entre eux (Blum *et al*, 2001). Il existe une controverse concernant la cause de ces encéphalopathies. Une des théories veut que le médicament ou ces métabolites se fixent aux protéines par liaisons covalentes, ce qui formerait un antigène déclenchant une réaction

immunitaire (Hess *et al*, 1997 ; Park *et al*, 1990). Une autre théorie expliquant cette encéphalopathie impliquerait le relargage de grandes quantités d'antigènes libérés dans le SNC après la lyse de nombreux trypanosomes entraînée par le traitement au Méarsoprol (Pepin *et al*, 1991, 1995). Il est intéressant de noter que l'apparition des encéphalopathies induites par le Méarsoprol n'est pas dépendante du stade de la maladie ni de la posologie instaurée (Haller *et al*, 1986). L'encéphalopathie arrive plus couramment à la seconde injection du médicament. Les tentatives visant à diminuer l'incidence des encéphalopathies avec de nouveaux dosages et schémas thérapeutiques se sont révélées infructueuses (Burri *et al*, 2000).

L'Eflornithine

L'Eflornithine ou encore l'Ornidyl, (*R,S*)- α -difluoromethylornithine, ou DFMO (Figure 15) a été décrit par Metcalf *et al*, comme un potentiel inhibiteur mécanique de l'ODC (Metcalf *et al*, 1978). L'Ornithine décarboxylase est une enzyme essentielle et de vitesse limitante dans la voie conduisant à la biosynthèse des polyamines. Les premières études décrites sur l'effet de la molécule sur des cellules mises en cultures ont montré un rapide épuisement des polyamines Putrescines et Spermidine. De plus, l'Eflornithine possède de fortes propriétés cytostatiques. Les premières recherches de propriétés anti-cancer *in vivo* furent cependant un échec, probablement en raison de la capacité des cellules mammifères à induire rapidement, une synthèse d'ODC et de transporteurs absorbants les polyamines des fluides extracellulaires (Quemener *et al*, 1994). Fait intéressant, l'Eflornithine a démontré son efficacité dans le traitement et la prévention des cancers colorectaux (Meyskens *et al*, 1999). Bacchi *et al*, (1980) ont les premiers rapporté l'activité anti-trypanosome de l'Eflornithine dans les années 1980, et cela a été admis et approuvé aux Etats Unis en 1990, en Europe en 1991 pour le traitement des deux stades de l'infection à *T. b. gambiense* (Kuzoe *et al*, 1993). A cause de son coût élevé et de la nécessité d'être injecté par une perfusion intraveineuse continue, elle n'est utilisée qu'au stade nerveux de la maladie. L'Eflornithine manque d'activité contre *T. b. rhodesiense* et toutes les autres espèces de trypanosomes sur lesquels elle a été testée.

Poulin *et al*, (1992) ont confirmé l'hypothèse du mécanisme d'action de l'Eflornithine en tant qu'inhibiteur suicide mécanique de l'ODC (voir la figure 20), en isolant le complexe covalent du médicament et d'un résidu cystéine 360 de l'ODC d'une souris. L'Ornithine décarboxylase humaine partage 99% de l'ADN de sa consœur murine (Hickok *et al*, 1987) et il est ainsi supposé qu'elle est inhibée par l'Eflornithine de la même façon.

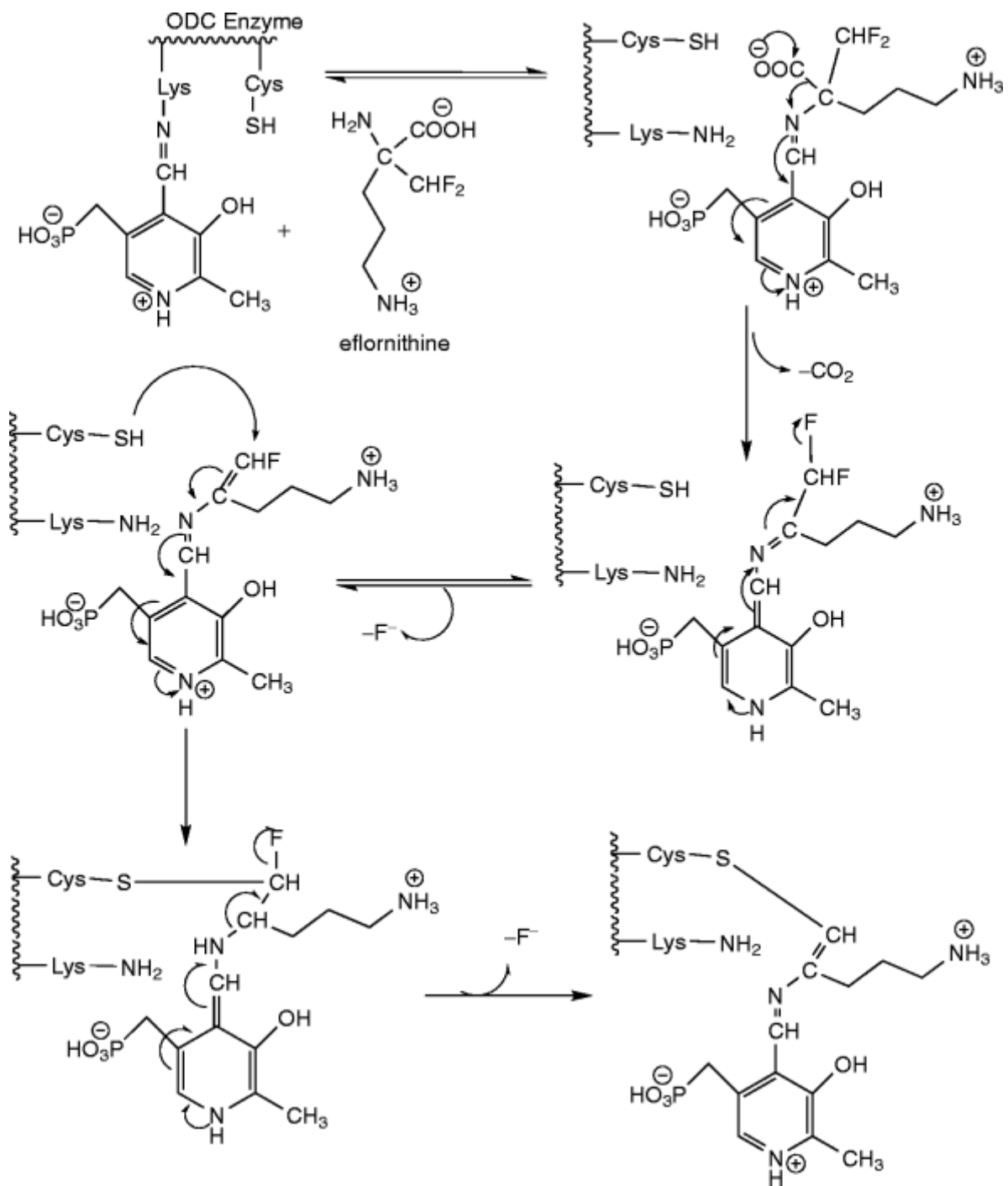


Figure 20 : Mécanisme d'action proposé pour l'Eflornithine : Mécanisme basé sur l'inhibition de l'Ornithine DéCarboxylase (Fries *et al*, 2003).

Le gène codant pour l'ornithine décarboxylase de *T. b. brucei* a été cloné et séquencé, et la protéine recombinante a pu être exprimée par *Escherichia coli* génétiquement modifié (Phillips *et al*, 1987 ; Phillips *et al*, 1988). La protéine est un homodimère avec une sous unité de poids moléculaire estimé de 45 kDa, contre 53 kDa en comparaison avec la protéine issue de la souris (Gupta *et al*,

1985). Les ornithines décarboxylases de souris et de *T. b. brucei* ont 61,5 % de séquences identiques. La structure cristalline de l'ODC de *T. b. brucei* complexé avec la molécule d'Eflornithine montre que le médicament forme également une liaison covalente avec une cystéine 360 (Grishin *et al*, 1999) comme avec l'enzyme de mammifère (Poulin *et al*, 1992).

Le mécanisme qui expliquerait la toxicité sélective de l'Eflornithine n'est pas encore totalement compris. Les sensibilités des ODC de souris et de *T. b. brucei* à l'inhibition par l'Eflornithine sont remarquablement proches (respectivement pour l'ODC du trypanosome et de la souris: K_i de 220 μM pour l'une et de 39 μM pour l'autre) (Metcalf *et al*, 1978 ; Phillips *et al*, 1987). La principale différence entre les deux enzymes est un extra-peptide de 36 acides aminés situé au niveau du C-terminal de l'enzyme de la souris (Phillips *et al*, 1988). Cette extension contient une séquence PEST (séquence riche en proline (P), acide glutamique (E), serine (S), et thréonine (T)), que l'on peut retrouver chez de nombreuses protéines eucaryotes connues pour leur capacité à se renouveler rapidement *in vivo* (Rogers *et al*, 1986 ;Rechsteiner *et al*, 1996). Une des explications proposées est basée sur cette différence de capacité de renouvellement. En effet l'ODC de *T. b. brucei* est très stable et ne se renouvelle pas à un taux détectable ce qui privilégierait la survie de l'enzyme de mammifère rapidement re-synthétisée au détriment de celle du parasite, entraînant alors sa mort (Phillips *et al*, 1988).

Ghoda *et al*, ont démontré, en comparant l'ODC de *T. b. brucei* à celle de souris que l'enzyme de la souris était beaucoup moins stable que celle du parasite (Ghoda *et al*, 1990).

De plus, lorsque le matériel génétique codant pour l'ODC de souris est placé et exprimé chez *T. b. brucei*, il a été démontré que l'enzyme reste stable ce qui suggère une voie de la dégradation faible ou inactive chez le trypanosome (Bass *et al*, 1992 ; Hua *et al*, 1995). Une autre possibilité, pouvant expliquer l'échec des premiers tests en tant qu'agent anticancéreux, serait que les cellules de mammifère sont capables de contourner l'inhibition de l'ODC en prenant de la Putrescine et de la Spermidine à partir du milieu extracellulaire. Les concentrations de ces polyamines sont faibles (Gahl *et al*, 1979) et *T. b. brucei* n'a qu'une très faible capacité à transporter les polyamines en comparaison avec *T. cruzi* son cousin d'Amérique. Ainsi ce manque de capacité d'importation de polyamines peut contribuer à la toxicité sélective de l'Eflornithine à l'encontre de *T. b. gambiense*.

La raison pour laquelle l'Eflornithine est inefficace contre *T. b. rhodesiense* n'est pas totalement comprise. Les souches de *T. b. gambiense* sensibles et de *T. b. rhodesiense* réfractaires ne montrent pas de différence dans l'absorption de l'Eflornithine ou dans l'absorption de Putrescine (Iten *et al*, 1997). L'inhibition de l'ODC par l'Eflornithine entre les deux espèces n'est pas significativement différente. Cependant l'activité de l'ODC est trois fois plus élevée chez le *T. b. rhodesiense* réfractaire à l'Eflornithine et semble avoir un taux de renouvellement plus élevé que chez *T. b. gambiense* (Iten *et al*,

1997). Comme les ODC de *T. b. brucei* et de *T. b. gambiense* sont identiques d'un point de vue de leur composition en acides aminés, d'autres facteurs cellulaires doivent être impliqués dans la différence des taux de renouvellement de l'enzyme. Bacchi *et al*, (1993) ont également comparé des isolats de *T. b. rhodesiense* sensibles et réfractaires à l'Eflornithine pour n'en ressortir aucune conclusion nette. Cependant, les données obtenues laissent penser qu'une altération dans le métabolisme AdoMet (S-AdenosylMethionine) pouvait être responsable de la résistance (Bacchi *et al*, 1993).

Ainsi, l'Eflornithine épuise le peu de réserves en Putrescine et en Spermidine de *T. b. brucei* à la fois *in vivo* et *in vitro* (Giffin *et al*, 1986). Les trypanosomes cessent alors de croître et se transforment en une forme courte et trapue qui n'a plus la capacité de faire varier ses VSG et qui sera finalement détruite par le système immunitaire de l'hôte (Bitonti *et al*, 1986).

Les effets de l'Eflornithine peuvent être inversés *in vivo* et *in vitro* mais pas par la L-ornithine *in vitro* (Nathan *et al*, 1981 ; Giffin *et al*, 1986 ; Phillips *et al*, 1987). L'épuisement des polyamines chez les trypanosomes traités à l'Eflornithine entraîne une diminution de 40 % de leurs taux de Trypanothione et de 60 % de monoglutathionylspermidine (Fairlamb *et al*, 1987). Il est possible que la baisse de ce taux de Trypanothione contribue au mécanisme d'action de l'Eflornithine (Fries *et al*, 2003).

1.8. Etude des nouveaux traitements

L'anti THA idéal doit être une molécule administrable *per os*, de coût de revient faible, sans effet secondaire et active aux deux stades de la maladie (Bisser *et al*, 2012). Il y a très peu de molécules remplissant ces critères de sélection, malgré les efforts du DNDi, un organisme dédié à la recherche sur les maladies tropicales négligées et la création d'un rassemblement financé par la communauté européenne (TRYPOBASE) (Dujardin *et al*, 2010).

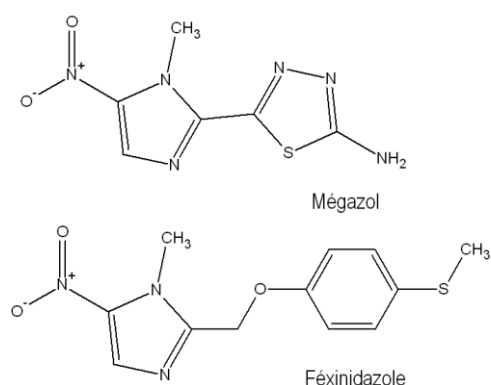


Figure 21 : Comparaison des structures chimiques du Mégazol et du Féxinidazole.

Un récent essai a été mené avec la Pafuramide maléate (ou DB289), un dérivé de la Pentamidine, pour conduire à un arrêt des recherches en phase III du développement du médicament en raison d'effets secondaires hépatiques et rénaux majeurs (Jacobs *et al*, 2011).

La seule molécule qui arrive petit à petit à faire

surface est le Fexinidazole. En effet, ce 5-nitro-imidazolé proche du Mégazol (voir figure 21) et lui aussi non dénué de mutagénicité (Tweats *et al*, 2012), a pu passer en phase clinique de son développement (Toreele *et al*, 2010). Cependant, il a été observé que des résistances apparaissaient en monothérapie et obligerait son utilisation en association au DFMO et donc de reperdre l'avantage du traitement par voie orale (Sokolova *et al*, 2010).

1.9. Métabolisation de molécules thérapeutiques

1.9.1. Définition

Le terme de métabolisme fait référence à la transformation, par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs au plan pharmacologique.

De nombreux tissus peuvent réaliser cette transformation (peau, poumon, rein, intestin...). Néanmoins le principal site de biotransformation est situé au niveau hépatique, grâce aux enzymes des microsomes. Ceci est expliqué par le flux sanguin très important de cet organe épurateur qu'est le foie. En effet, il reçoit environ 1,5 litres de sang par minute.

Les hépatocytes contiennent un grand nombre d'enzymes impliquées dans la transformation des médicaments, en particulier les réactions d'oxydoréduction, les hydroxylations ou la rupture oxydative des liaisons N-C et O-C. L'élément fondamental de ce système enzymatique est le cytochrome P450 comprenant de nombreuses isoenzymes. Les différentes étapes du métabolisme conduisent à la formation de substances hydrosolubles plus facilement éliminées par les milieux aqueux que sont les urines, la bile, la salive ou la sueur.

Schématiquement on distingue 2 phases de métabolisme selon les processus de transformation induits par ces enzymes : les réactions de phase I et celles de phase II (Lechat *et al*,2006 ;Loichot *et al*,2004).

1.9.2. Réactions de phase I

Il existe trois principales voies de synthèse de métabolites de phase 1

- ✓ Les réactions d'oxydation sont majoritairement localisées dans les microsomes hépatiques. Elles consomment du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit), de l'oxygène moléculaire et passent par les cytochromes P450.

- ✓ Les réactions de réduction sont beaucoup moins fréquentes et moins bien explorées. La réduction n'intervient pas exclusivement au niveau hépatique mais également dans l'intestin *via* la flore bactérienne.
- ✓ L'hydrolyse enfin est une voie métabolique banale, qui intervient dans le foie, dans différents tissus et même dans le plasma. Les enzymes du type « estérases » sont le plus souvent non spécifiques. La réaction d'hydrolyse par clivage d'un ester ou d'un amide, est chez l'homme, très rapide.

L'oxydation, la réduction et l'hydrolyse sont des biotransformations regroupées sous le terme de « métabolisme de phase I » qui conduit à des dérivés dont les groupements fonctionnels sont le plus souvent des hydroxyles (-OH), des amines (-NH₂) ou des carboxyles (-COOH).

La phase I est une étape conduisant à la formation de métabolites, qui peuvent soit être éliminés directement s'ils ont atteint un degré d'hydro-solubilité suffisant, soit poursuivre les processus de métabolisation par la phase II. La phase I n'est pas obligatoire : certains médicaments peuvent subir immédiatement la phase II.

1.9.3. Réactions de phase II

Les groupements fonctionnels issus des réactions de phase I peuvent être ensuite conjugués. C'est la réaction de phase II.

La phase II est une phase de conjugaison qui aboutit à la formation de substances conjuguées, hydrosolubles et facilement éliminées par les urines ou la bile.

Les métabolites ou les médicaments, subissent différentes réactions de conjugaison : glucurono-conjugaison ; sulfo-conjugaison ; acétylation ; alcoylation (transfert d'un groupement méthyle) pour donner un produit conjugué qui sera éliminé.

La conjugaison est le transfert sur un groupe fonctionnel (OH, NH₂, COOH) d'un composé de type : glucuronide, sulfate, glycolle, méthyle, acétyle...

La plus fréquente des réactions de métabolisation de phase 2 reste la conjugaison avec l'acide glucuronique, ou la glucurono-conjugaison. Elle est catalysée par le système enzymatique de la glucuronyltransférase et concerne les molécules possédant un groupement hydroxylé, carboxylé ou aminé. Les glucuronides sont très hydrosolubles ce qui explique la facilité avec laquelle ils sont éliminés dans l'urine et la bile.

Dans quelques cas, les esters sont instables et après hydrolyse dans l'urine ou le plasma redonnent la molécule mère.

Autres informations importantes sur la métabolisation

- ✓ Lorsqu'un médicament est métabolisé, il l'est rarement de façon unique et plusieurs voies métaboliques sont possibles. Tous les métabolites ne sont d'ailleurs pas toujours identifiés (en particulier à cause des problèmes analytiques qui se posent pour les isoler, et les caractériser).
- ✓ Il existe une spécificité pour certains substrats : les différents cytochromes ont en fonction de leur structure protéique une affinité différente pour les divers substrats (voir tableau 2)
- ✓ Certains substrats modifient l'activité des enzymes responsables des biotransformations
- ✓ Certaines enzymes des voies de métabolisme du médicament sont soumises à des polymorphismes génétiques qui peuvent modifier leur activité métabolique. On distinguera alors des métaboliseurs lents, intermédiaires, rapides et même ultra-rapides. Ce facteur intervient dans la variabilité de réponse à un médicament entre les individus.
- ✓ Les médicaments qui ont une forte affinité pour les enzymes hépatiques ont après administration orale une faible biodisponibilité due à l'effet de premier passage hépatique. (Lechat *et al*, 2006 ; Loichot *et al*, 2004).

	<i>CYP1A2</i>	<i>CYP2C9</i> *	<i>CYP2D6</i> *	<i>CYP3A4</i>
Substrat	Théophylline Caféine	Phénytoïne Diclofenac Warfarine	Codéine Captopril Imipramine Fluoxétine Metoprolol	Ciclosporine Tacrolimus Ketoconazole Midazolam Statine
Inhibiteur	Cimétidine Quinolones Fluvoxamine	Isoniazide Ritonavir	Quinidine Fluoxétine	Macrolides Naringénine (jus de pamplemousse) Antifongiques azolés Antiprotéases
Inducteur	Rifampicine Omeprazole Cigarette	Rifampicine		Carbamazépine Phénytoïne Phénobarbital Millepertuis (tisanes...)

Tableau 2 : Principales iso-enzymes du cytochrome P450 humain ; Leurs implications dans le métabolisme des médicaments (liste de molécules et de cytochromes non exhaustive). * = polymorphisme génétique avec retentissement fonctionnel (Lechat *et al*, 2006)

2. Le Mégazol

2.1. Mode d'action

L'activité biologique du Mégazol comme la plupart des hétérocycles nitrés est liée à la réduction du groupement nitro (R-NO₂) en radical anion (Kedderis *et al*, 1988 ; Edwards, 1993). Ce radical ainsi ionisé évolue vers sa forme Nitroso (R-NO) en milieu anaérobie, et donne les dérivés du stress oxydatif et ses radicaux libres en milieu aérobie. Une étude a permis d'observer, par résonance paramagnétique électronique, la formation de ce radical anion du Mégazol en milieu anaérobie *via* différents systèmes enzymatiques testés (cytochrome P450 réductase, foies de rats, microsomes synthétisés à partir de *T. cruzi*). De plus le Mégazol, après être passé sous sa forme radicalaire anionique a bien donné naissance à un stress oxydatif. Il interfère donc bien avec le métabolisme de l'oxygène du parasite mais sans toutefois constituer le mécanisme d'action principal de la molécule (Viode, 1999).

Pour en apprendre un peu plus sur ce radical anion, une étude en radiolyse pulsée a permis de mettre à jour son faible potentiel redox (-430mV) qui théoriquement, défavorise sa bio-réduction normale. Or, en anaérobiose, ce radical anion se dismute plus facilement que celui du Nifurtimox. De plus, en milieu aérobie, avec présence du radical anion du Mégazol et de l'anion superoxyde, ce dernier réagit plus rapidement avec le radical anion du Mégazol qu'avec le radical anion du Nifurtimox. Ces caractéristiques cinétiques privilégient la formation de l'intermédiaire Nitroso (Viode *et al*, 1997), connu pour son effet létal par capture des thiols intracellulaires (Mulcahy *et al*, 1989 ; Ehlhardt *et al*, 1988).

Ces Thiols ont pour fonctions, de régénérer le NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit), le NADPH, de piéger les radicaux libres et de détoxifier la cellule. Maya *et al*, (2003) ont testé différents composés comportant des groupes -nitro, dont le Mégazol, pour en déterminer leurs cibles chez *T. cruzi*. Cette étude a conclu que toutes les molécules testées agissaient en formant un cycle par réaction d'oxydoréduction, sauf le plus actif de leur sélection (le Mégazol) qui lui, agissait en piégeant les groupements -thiols dont notamment ceux de la Trypanothione, cette enzyme essentielle au processus de détoxification du parasite.

Des chercheurs d'Amérique du sud, se sont intéressés à la relation structure activité de la molécule en étudiant ses propriétés électroniques, optiques et magnétiques, jusqu'à découvrir ses sites actifs. Ainsi, le groupe amino (R-NH₂) est un donneur d'électrons selon la localisation de l'HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) et l'attaque nucléophile a lieu au niveau de l'oxygène 19 du groupement nitro (voir figure 22) (Flores-Holguin *et al*, 2004, 2005 ; Rosselli *et al*, 2005, 2006).

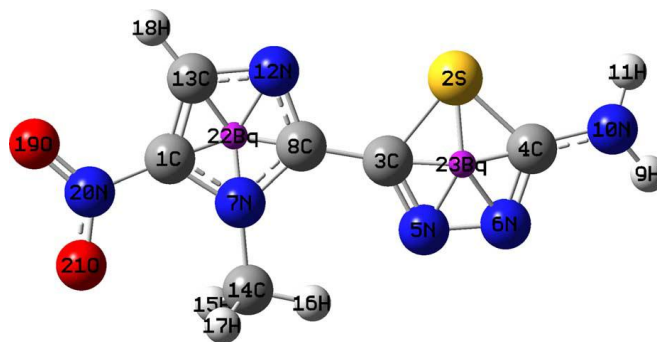


Figure 22: Structure moléculaire du Mégazol (Flores-Holguin *et al*, 2005)

Les trypanosomes redoutent le stress oxydatif. En effet, ils n'ont, ni catalase (Docampo *et al*, 1981), ni glutathionne peroxydase (Boveris *et al*, 1980), ni de molécules anti oxydantes (Morello *et al*, 1988). Une des enzymes à leur disposition est la trypanothione réductase (Fairlamb *et al*, 1985 ; Krauth-Siegel *et al*, 1987) qui régénère le cofacteur permettant l'activité, une fois qu'il est réduit. De nombreux inhibiteurs de la trypanothione réductase ont été découverts (Henderson *et al*, 1988 ; Girault *et al*, 1997 ; Walton *et al*, 2011 ; Patterson *et al*, 2011), mais aucun n'a démontré d'activité intéressante *in vivo*. Or, le Mégazol ne posséderait aucune activité sur la trypanothione réductase (Viode, 1999, Perie *et al*, 1996).

Une autre cible potentielle pour lutter contre le trypanosome peut être la Super Oxyde Dismutase (SOD) intervenant dans le métabolisme de l'oxygène. Les deux SOD de l'Homme et du trypanosome diffèrent fortement de par leurs structures et la nature du métal dans le site actif : Fe pour le parasite et Cu-Zn pour l'hôte (Le Trant *et al*, 1983). Le gène d'une SOD ferrique 5 à 8 fois plus active que l'originale a été cloné sur *T. cruzi*, puis divers antiparasitaires classiques ont été testés. La plupart n'ont eu aucun impact thérapeutique par rapport à leur action habituelle, sauf pour le violet de gentiane et le Benznidazole auxquels les trypanosomes étaient bien plus sensibles (Temperton *et al*, 1996, 1998). Le Mégazol a été testé en tant qu'inhibiteur de la SOD ferrique avec des résultats probants, contrairement à son jumeau structural dont le soufre a été remplacé par un oxygène, et qui n'a ni activité biologique ni d'effet inhibiteur de la SOD (Viode *et al*, 1998).

Le trypanosome africain se sert d'un transporteur spécifique pour internaliser les purines de l'hôte car il n'a pas la capacité de les synthétiser. Il s'agit du transporteur d'adénosine P2 (Hammond *et al*, 1984). Ce transporteur P2 reconnaît le motif (N=C-NH₂), il reconnaît ainsi les diamidines et les mélaminophényls arsenicaux dont il permet l'entrée dans l'espace cellulaire (Barret *et al*, 1999).

Certaines souches de trypanosomes ne possèdent pas ce transporteur, ce qui explique leurs résistances à ce type de molécules (Barret *et al*, 1999). Comme les amino purines, l'oxyde de Melarsen et d'autres molécules, le Mégazol possède le motif (N=C-NH₂) permettant son internalisation cellulaire, (voir figure 18) mais il s'est avéré que, en plus de la possibilité d'internalisation par ce transporteur, la plus grande partie du Mégazol intracellulaire provient d'une simple diffusion passive. Ainsi là où, *in vivo*, une résistance au Melarsoprol et autres diamidines apparaît à cause de souches mutantes de trypanosomes n'exprimant plus ou trop peu le transporteur P2, le Mégazol pourra continuer d'être actif de par son mode de passage double (Barret *et al*, 2000).

Une autre cible potentielle d'action du Mégazol est une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale du parasite, la fumarate réductase (ou FR). Cette enzyme est essentielle pour la production énergétique de nombreux Trypanosomatidés. Elle permet de remplacer l'oxygène, comme dernier accepteur d'électrons, par le fumarate. Sur les 13 molécules testées par Turrens *et al*, (1996) le Mégazol est le meilleur inhibiteur de cette enzyme, devant le Fexinidazole.

Chez *T. cruzi*, le Mégazol induit, comme beaucoup d'autres antiparasitaires, un stress oxydatif après sa réduction sous la forme radicalaire anionique. Cependant, le plus important de sa toxicité résiderait dans sa capacité à inhiber la chaîne respiratoire mitochondriale et notamment par son action sur la fumarate réductase. De plus, sa forte capacité à générer des intermédiaires nitroso, augmenterait sa toxicité pour le parasite en utilisant les thiols intracellulaires essentiels pour se défendre contre les radicaux libres (Bouteille *et al*, 1999).

2.2. Activité du Mégazol

Les premiers tests effectués à la découverte de cette molécule ont permis d'attribuer au Mégazol des propriétés antibactériennes et anti protozoaires importantes (Berkelhammer *et al*, 1968 ; Bachmann *et al*, 1968 ; Carvajal *et al*, 1968):

- ✓ Propriétés antibactériennes : activités *in vitro* sur cultures de gonocoques, méningocoques, bacilles Gram- et Gram+, et *in vivo* sur souris et poules avec infections Gram-, Gram+, cocci.
- ✓ Propriétés anti protozoaires : sur *T. cruzi*, *T. equiperdum*, *L. donovani*, *Trichomonas vaginalis* et *Entamoeba histolytica*.

Les premiers tests chez les souris parasitées avec *T. brucei* et également avec *T. cruzi*, ont démontré une efficacité prometteuse (Winkelmann *et al*, 1977). En 1982, Filardi et Brener ont démontré

une efficacité sur des infections à *T. cruzi* et même sur des souches résistantes au Nifurtimox et au Benznidazole (Filardi *et al*, 1982 ; 1987). Plus tard son efficacité, avec destruction des formes intracellulaires de *T. cruzi* chez le rat a été démontrée (Lages-Silva *et al*, 1990) là où, le Benznidazole et le Nifurtimox ne s'avèrent pas efficaces (Rodriguez *et al*, 1995).

Des chercheurs travaillant sur *T. cruzi* ont pris des clichés du parasite sain et du parasite traité par du Mégazol, ce qui permet de se rendre compte « à l'œil nu » des effets de la molécule sur l'organisme et la morphologie du parasite, voir figure 23 page suivante (Salomão *et al*, 2010).

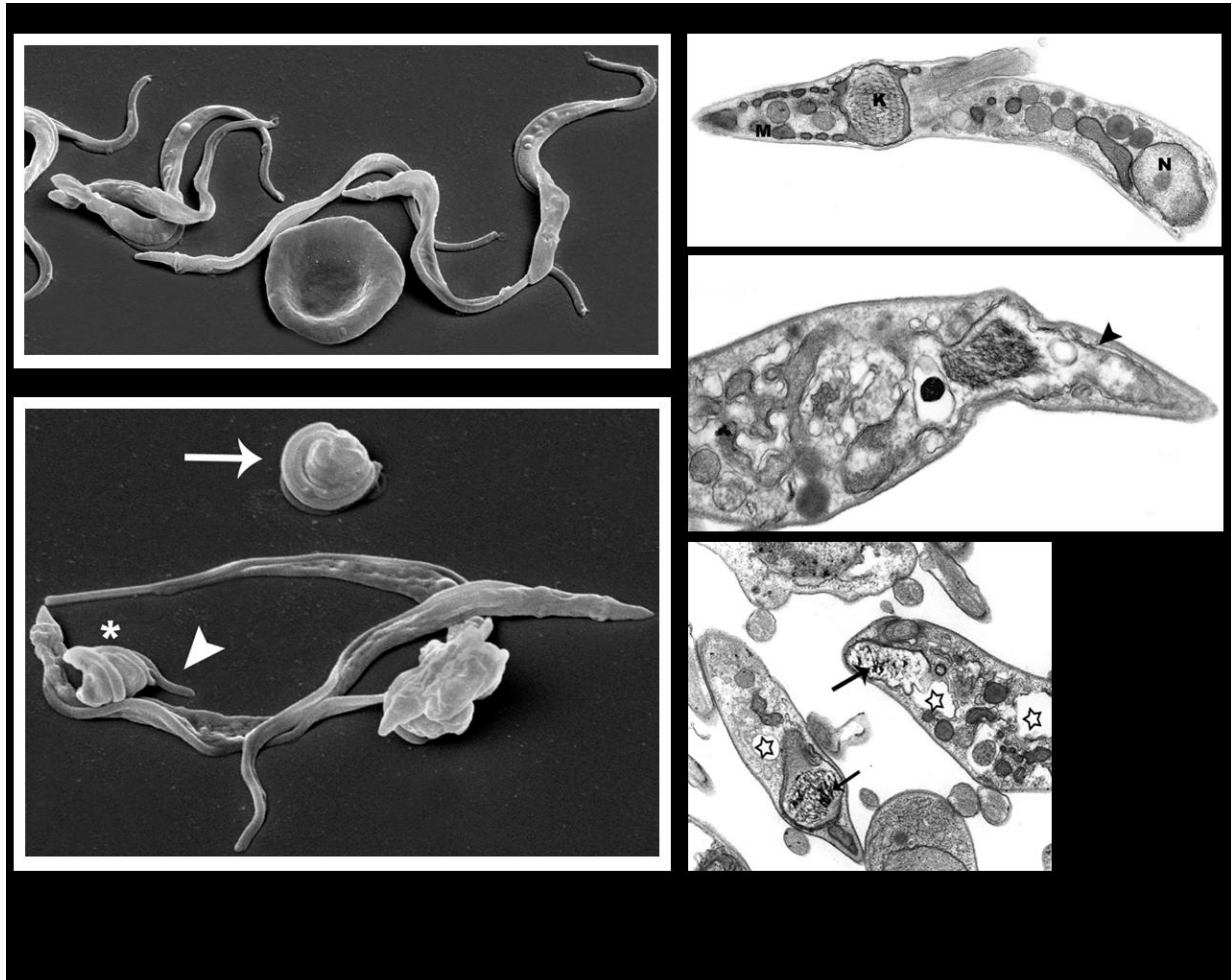


Figure 23 : Effets du Mégazol sur la morphologie de *T. cruzi* . d'après (Salomão et al, 2010)

A gauche : Microscopie électronique de la forme trypomastigote de *T. cruzi* :

En haut : Parasites non traités avec une morphologie et une topologie de surface normale.

En bas : Parasites traités pendant 24h par du Mégazol à 9,9 μM conduisant à la torsion (astérisque) et à l'enroulement du corps du parasite (flèche) ainsi qu'à un raccourcissement du flagelle (pointe de flèche).

A droite : Microscopie électronique à transmission de la forme trypomastigote de *T. cruzi* :

Image du haut : Parasite contrôle avec le corps allongé et la morphologie caractéristique normale: de la mitochondrie (M) du kinétoplaste (K) et du noyau (N).

Les deux images du bas montrent le parasite traité pendant 24 h à la concentration de 9,9 μM de Mégazol ; avec pour conséquences une altération, de l'ADN kinétoplastique (flèches noires), de la mitochondrie (pointe de flèche) et une vacuolisation intense (étoiles blanches).

Concernant l'activité biologique sur les trypanosomes du groupe *brucei*, des tests *in vitro* ont été menés sur *T. brucei* AnTat1.9 cultivé en milieu acellulaire semi-synthétique. Ces derniers ont montré l'efficacité du Mégazol (0,1 µg/mL ou 0,45 µM) après 36h d'incubation (Marie-Daragon *et al*, 1994 ; Bouteille *et al*, 1995). Efficacité améliorée d'un facteur 10 par rapport à la Suramine au même temps d'incubation mais pourtant à une concentration plus élevée (1 µg/mL ou 0,7µM) (Bouteille *et al*, 1995).

Des tests *in vivo* ont également été menés notamment sur des souris infectées par *T. brucei brucei* AnTat1.9, souche entraînant la forme aiguë de la maladie avec la mort de l'animal en 3 à 4 jours, mais sans atteintes cérébrales (mauvais modèle pour le stade 2 de la maladie). Le Mégazol à une dose unique de 20 mg/kg (0,5 mg/souris) mène à 100% de guérison pour des infections de : 12 à 24 heures s'il est utilisé par voie IP et de 36h lors de son administration *per os* (Bouteille *et al*, 1999).

La même expérience a été menée sur des souris infectées par la souche *T. b. brucei* AnTat1.1E qui est responsable de la forme chronique de la maladie avec invasion du système nerveux de l'animal à partir du 21^{ème} jour après inoculation (avec mort de la souris entre 26 et 37 jours post infection). Une fois traitées en IP par une seule dose de 20 mg/kg de Suramine, les souris sont transitoirement indemnes de parasites, mais uniquement dans le sang périphérique, car 11 à 43 jours plus tard les parasites sont de nouveau présents (Bouteille *et al*, 1999).

L'étude des tissus cérébraux des souris après leurs rechutes montrent des infiltrats lymphocytaires situés autour des vaisseaux sanguins du parenchyme. En effet il a été démontré que pendant cette période d'a-parasitémie périphérique apparente, les parasites sont toujours présents dans les plexus choroïdes de l'animal (Jennings *et al*, 1983). Les animaux peuvent être maintenus dans cette a-parasitémie fictive par des rechutes/traitements successifs (de 2 à 4), jusqu'à 100 jours, après quoi, l'atteinte cérébrale devient trop importante et apparaissent des signes neurologiques comme la perte de l'équilibre, convulsions et altérations de la fonction motrice (incoordination et difficultés de déplacement, paralysies des membres), somnolence et perte de poids. L'étude du tissu cérébral montre alors une progression allant de simples lésions inflammatoires à une méningite, jusqu'à une méningo-encéphalite. Toutes ces lésions évoluent à travers les espaces péri-vasculaires, les parenchymes cérébraux et cérébelleux et le trypanosome lui-même se retrouve dans le SNC, notamment dans les plexus choroïdes, les méninges et les parenchymes (Keita *et al*, 1997).

Un nouveau schéma thérapeutique consistant en une bithérapie Suramine / Mégazol a alors été testé sur des souris infectées par *T. b. brucei* AnTat1.1E. Le schéma est le suivant :

- ✓ Suramine 20 mg/kg en injection IP au 21^{ème} jour
- ✓ suivi d'une dose par jour de Mégazol en IP ou *per os* à 80 mg/kg pendant 3 jours

Les parasites disparaissent et ne réapparaissent toujours pas après une période de suivi de plus de 4 mois, ce qui est plus que le délai de rechute normale d'environ 10 à 50 jours avec cette souche (Bouteille *et al*, 1995). Il est alors possible de parler de guérison de ces souris. Ce même schéma thérapeutique testé chez des rats a permis d'obtenir une guérison avérée chez 10 rats sur 12, et une prise de poids 2 semaines après le traitement comparable au groupe témoin (Darsaud *et al*, 2004).

Des souris infectées puis maintenues par des doses de Suramine (20 mg/kg) en un cycle de rechutes / traitements successifs permettant le développement du parasite uniquement dans le cerveau, ont été traitées à 100 jours post infection avec le schéma thérapeutique suivant :

- ✓ une première injection de Suramine (20mg/kg) au jour 1 du traitement,
- ✓ puis les 4 jours suivants une dose *per os* de Mégazol (80mg/kg).

En moins d'une semaine après ce traitement une amélioration de l'état général de ces souris a été observée (mobilité et reprise normale de l'alimentation). De plus, un suivi de l'encéphale (à 7 jours, 14, puis 1, 2, 4 et 6 mois) des souris montre que dès 2 mois, après la fin du traitement, il n'y a plus de lésions inflammatoires (Enanga *et al*, 1998).

Devant de tels résultats les chercheurs ont voulu se rapprocher au mieux du modèle humain en mettant au point un modèle expérimental de trypanosomose à *T. b. gambiense* MBA ITMAP 1811 sur des singes verts, cercopithèques, (*Chlorocebus aethiops*) (Ouwe-Missi-Oukem-Boyer *et al*, 2006). Sur 6 cercopithèques infectés, cinq d'entre eux étaient au stade lymphatico sanguin de la maladie et ont été traités par une seule dose de Mégazol (100 mg/kg) *per os* (dans des bananes). Le sixième singe, présentant des signes cliniques d'atteinte neurologique ainsi que des trypanosomes dans le LCR, a lui aussi reçu une dose unique de Mégazol à 100 mg/kg *per os* suivie immédiatement par une dose de Suramine à 20 mg/kg en voie IV. Deux ans après ce traitement il n'y a eu aucune rechute de ces 6 singes (Enanga *et al*, 2000 ; Chauvière *et al*, 2003).

2.3. Pharmacocinétique

Un premier aperçu de la cinétique du Mégazol, illustré dans la figure 24, a été fait en 1968 dès la création de la molécule, par dosage sur un pool de sang de 10 souris prélevées par ponction cardiaque (500 μ L chacune) (Redin *et al*, 1968).

L'étude de la pharmacocinétique du Mégazol a débuté par la mise au point d'une technique de dosage du Mégazol par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) permettant une détection dans les fluides biologiques jusqu'à 2 ng/mL (Enanga *et al*, 1997). Les premières détections de Mégazol tritié chez

la souris saine ont permis de conclure que le meilleur pic plasmatique obtenu après administration de 80 mg/kg de Mégazol, s'obtenait grâce à une prise *per os* (33,8 μ g/mL), plutôt qu'en IP (19 μ g/mL). De plus la Suramine (20 mg/kg) injectée en IP au préalable (24 h avant), améliore la vitesse d'absorption digestive du Mégazol tout en diminuant sa concentration plasmatique (19,9 μ g/mL *versus* 33,8 μ g/mL). Une même prise de Suramine (20 mg/kg ; 24h avant) chez une souris infectée par *T. b. brucei* AnTat1.1E, permet un volume apparent de distribution du Mégazol augmenté (5,6 L/kg *versus* 0,9 L/kg) et une augmentation de la demi-vie de la molécule (3 heures *versus* 0,7 heure) (Enanga *et al*, 1999).

Une autre étude, toujours menée par Enanga *et al*, en 2000, a été réalisée chez le singe vert cercopithèque (*Chlorocebus aethiops*) infecté par la souche MBA de *T. b. gambiense*. Le Mégazol a été administré *per os* (100 mg/kg) et les concentrations plasmatiques maximales détectées après 4 à 8 heures après la prise étaient de 16,8 à 46 μ g/mL. Cette étude a également permis de déterminer le taux de passage du Mégazol dans le LCR (de 5,2 à 10,5 % de la concentration plasmatique), la demi-vie du Mégazol avec des variations de 2,7 à 2,89 heures. Cette demi-vie d'élimination, bien plus courte que celle des autres composés 5-nitroimidazolés (Metronidazole 7-8h ; Tinidazol 12-13h ; Ornidazole 13h ; Secnidazole 17-29h) excepté le Fexinidazole 1-3h (Torreele *et al*, 2010), est un avantage face aux propriétés mutagènes de la molécule, car elle est ainsi rapidement éliminée et moins toxique pour l'organisme. Après 24h, une quantité plasmatique résiduelle d'environ 0,2 μ g/mL peut être retrouvée. L'élimination du Mégazol se fait en majorité par les urines en excréant principalement la molécule non métabolisée (Enanga *et al*, 2000). L'étude précise des métabolites du Mégazol est l'objet de notre travail.

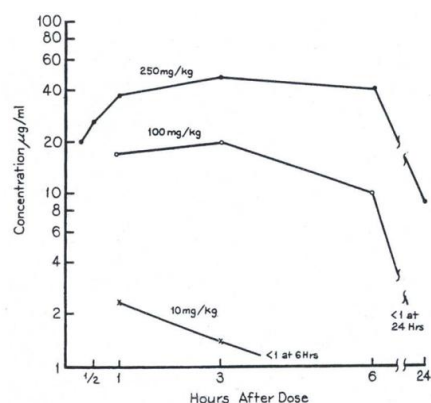


Fig. 1. Concentration of CL 64,855 in plasma of mice after single oral doses.

Figure 24: Concentration plasmatique de Mégazol après ingestion de mono-doses (Redin *et al*, 1968). On peut déjà trouver le T_{max} de 3h retrouvé plus tard par Enanga *et al*, 1997.

2.4. Tolérance, toxicité

Durant l'année 1968, la même année qui a vu la découverte de la molécule par les chimistes de American Cyanamid Co, des d'articles publiés par les chercheurs de cette même entreprise pharmaceutique ont apporté une série de données très impressionnantes, avec des tests de la molécule à des concentrations « aléatoires », sur toute sorte d'animaux (souris, rats, poussins voir des cochons) contaminés par des bactéries et des parasites de tout type. Toutefois certains de ces articles font référence à des études préliminaires, n'ayant sans doute pas été publiées, pouvant comporter des essais de concentrations extrêmes qui auraient pu être intéressants pour l'étude de la toxicité de cette molécule (Burden et al, 1968 ; Redin et al, 1968 ; Layton et al, 1968).

Ainsi, Burden *et al*, ont montré qu'une dose par jour de 195 mg/kg *per os* pendant 5 jours reste bien tolérée par la souris (infectée par *Trichomonas vaginalis*), là où une dose quotidienne de 650 mg/kg *per os* commence à donner une mauvaise tolérance avec une perte massique de 17% de la masse initiale (Burden *et al*, 1968). Redin *et al*, (1968) confirment la bonne tolérance de la molécule par la souris et indiquent que la dose létale médiane (DL₅₀) est de 1 400 mg/kg [1 170 ; 1 660]. Layton *et al*, (1968) ont infecté des porcelets sevrés, avec *Salmonella enterica*, et les ont traités pendant 2 semaines par du Mégazol à environ 16 mg/kg. Tous les porcelets non traités avaient de la fièvre, et sont morts, contre un seul décès pour les traités. Chez les porcelets traités par le Mégazol aucune modification de masse n'a été notée durant l'étude.

De plus lors des tests effectués, d'une part sur la souris avec des doses de 80 mg/kg x 4 *per os* et d'autre part chez le primate avec une dose unique à 100 mg/kg *per os* aucun effet d'intolérance n'a été rapporté (Bouteille *et al*, 1999)

2.5. Mutagénicité

Les premiers tests de mutagénicité de molécules sont arrivés avec la mise au point du test d'Ames. Il s'agit de mettre en contact des souches de *Salmonella* n'ayant pas la capacité de transformer un substrat en histidine, essentiel pour leur survie, dans un milieu qui en est dénué. Ainsi, si la molécule induit la capacité à auto-synthétiser l'histidine, la souche survit et la molécule est donc mutagène. Il peut aussi être ajouté un extrait de foie (rat ou autre), le « S9 mix », à la molécule testée pour étudier si les métabolites de la molécule sont mutagènes (Ames et al, 1975).

Ainsi, il a été constaté que des composés nitrés comme le Nifurtimox (nitrofurane) et le Benzimidazole (nitroimidazolé), très largement utilisés contre la maladie de Chagas avaient, une activité mutagène, en plus de leurs nombreux effets indésirables (Ferreira *et al*, 1986 ; 1988). Le Mégazol, un 5-nitroimidazolé, a lui aussi été testé d'abord en culture, avec trois souches (TA 98 ; TA 100 ; TA 102) de Salmonelles dont seulement les souches TA 98 et TA 102 avaient mutées (Ferreira *et al*, 1986), puis, avec 3 souches de Salmonelles (TA 98 ; TA 98dnp₆ ; TA 98nr qui n'a pas de nitro-reductase) et là, 2 souches sur 3 (TA 98 et TA 98dnp₆) mises en contact avec les échantillons sériques, avaient mutées que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, sans que l'ajout de foie (métabolisation) ne fasse muter la troisième souche. Mais pour les trois souches il y avait une mutagénicité dans les urines, ce qui suggère une autre voie de métabolisation que le foie, *in vivo* (De Morais *et al*, 1998 ; Ferreira *et al*, 1986). Les souches de salmonelles ne possédant pas de nitro-réductase ne semblent pas donner de mutagénicité, en effet, une nitro-reductase classique de *Salmonella typhimurium* est une flavoprotéine catalysant la réduction de la fonction nitro (-NO₂) présente sur les cycles aromatiques pour donner des métabolites toxiques, mutagènes ou cancérigènes (Watanabe *et al*, 1998).

Plus tard, Enanga *et al*, ont mis en contact des trypanosomes, avec des doses croissantes de Mégazol jusqu'à sélectionner les trypanosomes mutants (dont l'ADN a été altéré) de plus en plus résistants à la molécule, mais qui en plus, avaient développés des résistances croisées avec d'autres molécules anti-trypanosomes (Enanga *et al*, 2003).

D'autres études de mutagénicité ont été menées dont celle de Poli *et al*, (2002) qui a démontré la géno- et cyto- toxicité du Mégazol lors de son administration concomitante à la Bléomycine. Cette toxicité est cependant dépendante de la durée du traitement. En effet, le taux d'ADN lésé est plus fort lors d'un traitement court (1-4 h) que lors d'un traitement long (20-40 h), ce qui suggère un mécanisme de réparation du matériel génétique lésé.

De plus, cette étude n'a pas montré d'augmentation significative d'événements de mutation et/ou de recombinaison chez des levures après traitement par le Mégazol, avec ou sans addition de cytochrome P450. Cependant une cytotoxicité est apparue chez la levure dépourvue de cytochrome P450 alors que chez les autres cet événement n'était pas observable (Poli *et al*, 2002). La plus récente des études conclue à la mutagénicité du Mégazol ainsi qu'à sa génotoxicité et à sa clastogénicité (rupture du matériel génétique induisant des aberrations chromosomiques) (Nesslany *et al*, 2004).

2.6. Recherche d'un composé atoxique

Au vu des découragements successifs concernant la toxicité et la mutagénicité du Mégazol des modifications de la structure chimique du Mégazol ont été menées afin d'optimiser son activité thérapeutique sans obtenir de composante toxique. Tout d'abord en ajoutant des substituants en position 4' (voir figure 25) du cycle imidazole pour faire varier son potentiel redox (Chauvière *et al*, 2000). La présence du groupement nitro en 5' (voir figure 25) semble essentielle à l'activité trypanocide de la molécule, car dépourvue de ce groupement la molécule perd toute action (Bouteille *et al*, 1999). Bouteille *et al*, ont également testé des dérivés intermédiaires de synthèse du Mégazol (Sulfoxyde et Sulfone) ainsi que du Mégazol substitué en position 4' par -Br ; -CH₃ ; -CF₃. Pour toutes ces molécules, l'activité trypanocide a été diminuée voir perdue. De la même manière, Chauvière *et al*, (2003) ont synthétisé des dérivés du Mégazol en rajoutant un glucose pour une meilleure absorption de la molécule. Au final, dès que la structure mère du Mégazol est modifiée, l'activité est diminuée ou perdue.

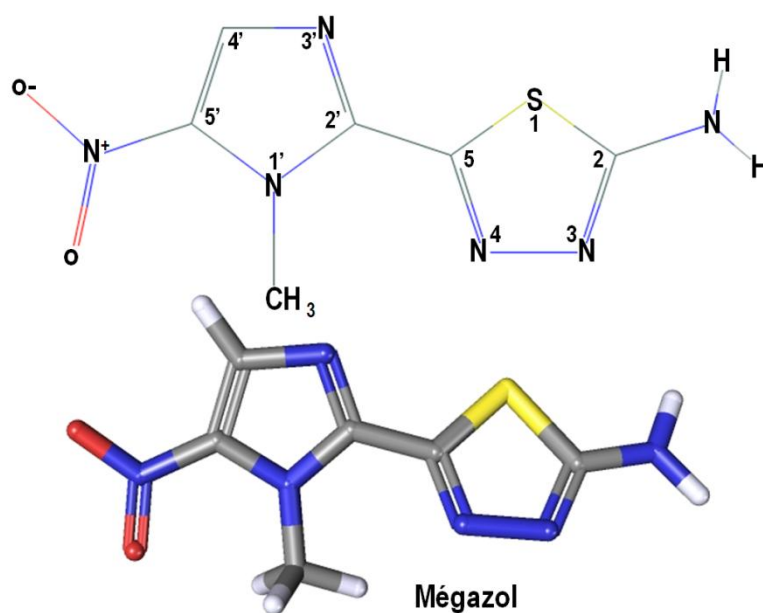
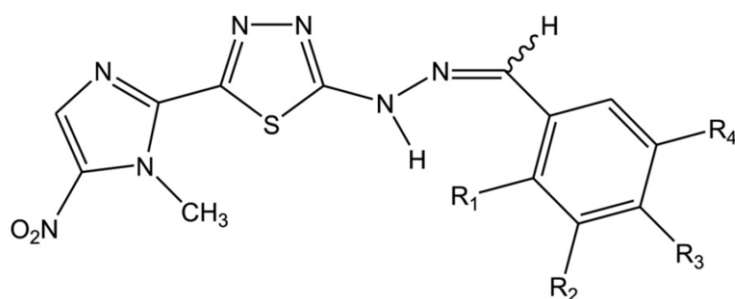


Figure 25 : Structure chimique du Mégazol 2D et 3D (pubchem compound)

D'autres chercheurs d'Amérique du sud se sont intéressés à l'activité de dérivés du Mégazol mais cette fois sur *T. cruzi*. Certaines de ces recherches ont abouti à la découverte d'une molécule appelée la Brazilzone A (S1 de la figure 26), possédant une DL₅₀ deux fois plus puissante que celle du Mégazol (Carvalho *et al*,



S1: R ₁ = H; R ₂ = OH; R ₃ = OH; R ₄ = H	S5: R ₁ = H; R ₂ = <i>t</i> -Bu; R ₃ = OH; R ₄ = <i>t</i> -Bu
S2: R ₁ = H; R ₂ = H; R ₃ = OH; R ₄ = H	S6: R ₁ = H; R ₂ = H; R ₃ = Cl; R ₄ = H
S3: R ₁ = H; R ₂ = H; R ₃ = Br; R ₄ = H	S7: R ₁ = H; R ₂ = OH; R ₃ = OCH ₃ ; R ₄ = H
S4: R ₁ = H; R ₂ = H; R ₃ = NO ₂ ; R ₄ = H	S8: R ₁ = OH; R ₂ = H; R ₃ = H; R ₄ = H

Figure 26 : Structure moléculaire de dérivés du Mégazol,

la Brazilzone A est la molécule S1, d'après (Salomão *et al*, 2010)

2004 ; Carvalho *et al*, 2008). D'après l'étude de Salomão *et al*, (2010), l'activité des différents composés n'est pas comparable *in vivo* et *in vitro*. En effet le composé S1 montre une très forte activité *in vitro* et pas du tout *in vivo*. Les molécules les plus prometteuses semblent être les S2 et S3 (S2 est actif à des doses plus faibles que S3), leur toxicité notamment leur génotoxicité est en court d'analyse.

3. Objectifs

Déterminer la dose minimale efficace du Mégazol par expérimentation animale chez la souris infectée par *T. b. brucei* AnTat1.1E, dans l'espoir de trouver une diminution de la dose thérapeutique entraînant une baisse proportionnelle de sa mutagénicité.

Rechercher les métabolites du Mégazol. Comparer leurs présences dans différents milieux biologiques (plasma, urine) prélevés chez les souris traitées. Caractériser les métabolites du Mégazol. Cela, afin de déterminer s'il existe un de ces métabolites qui aurait une activité trypanocide dénuée de mutagénicité.

4. Matériel et Méthodes

4.1. Expérimentation animale

4.1.1. Souris

Il s'agissait de souris Swiss (B) femelles (âgées de 8 semaines, masse moyenne à l'infection 25 g) toutes issues du laboratoire de Touraine, élevage Depré, St Doulchard, France. Ces animaux sont restés pendant toute la durée de la recherche dans l'animalerie de la faculté de médecine et de pharmacie de Limoges avec des conditions de vie stables que ce soit pour la température ou le cycle jour/nuit ou pour la nourriture et l'eau (*ad libitum*).

Sept groupes composés de 11 souris ont été constitués. Ces groupes ont été déterminés aléatoirement.

- ✓ Groupe 1 : 80 mg/kg/jour sur 3 jours
- ✓ Groupe 2 : 60 mg/kg/jour sur 3 jours
- ✓ Groupe 3 : 40 mg/kg/jour sur 3 jours
- ✓ Groupe 4 : 20 mg/kg/jour sur 4 jours
- ✓ Groupe 5 : 10 mg/kg/jour sur 4 jours
- ✓ Groupe 6 : Témoins infectés et non traités
- ✓ Groupe 7 : Témoins non infectés et non traités

4.1.2. Trypanosomes

La souche *T. b. brucei* AnTat 1/1E (ITMAS 190702) a été utilisée pour ces expérimentations. C'est un clone pléiomorphe issu de l'EATRO (East African Trypanosomiasis Research Organization) isolé en 1966 en Ouganda (Bouteille *et al*, 1995 ; Darsaud *et al*, 2004). Elle a été obtenue auprès de l'institut de Médecine Tropicale d'Anvers.

4.1.3. Infection

Avant l'infection des lots, les trypanosomes ont été décongelés puis leur mobilité a été vérifiée à l'aide d'un microscope optique. Ils ont d'abord été injectés à des souris pour s'y développer puis, ont été

comptés puis dilués dans une solution de NaCl 0,9% avant l'infestation finale consistant en une injection IP de 1 000 parasites dans un volume total de 100 µL.

4.1.4. Protocole thérapeutique

Pour utiliser le Mégazol au maximum de son activité thérapeutique nous avons basé le choix du protocole thérapeutique sur l'étude pharmacocinétique d'Enanga *et al*, (1999). En effet, cette étude a permis, grâce à du Mégazol tritié (Chauvière *et al*, 1998) d'obtenir une série de résultats pharmacocinétiques de grande importance pour notre étude :

- ✓ L'élimination du Mégazol est principalement urinaire, d'où le choix de recueillir les urines pour la recherche d'éventuels métabolites.
- ✓ A une même dose de Mégazol (80 mg/kg), les taux plasmatiques sont supérieurs après administration PO plutôt qu'IP, d'où le choix du traitement par gavage.
- ✓ Le Mégazol associé à la Suramine injectée 24h auparavant :
 - atteint son *Tmax* en 2 h contre 4 h administré en monothérapie,
 - augmente le volume de distribution de la molécule à 5,6 L/kg contre 0,9 L/kg seul,
 - augmente la demi-vie d'élimination à 3 h contre 0,7 h seul.
 D'où le choix de l'association Suramine / Mégazol.

Nous avons ainsi pu fixer un protocole de traitement illustré dans le tableau 3 ci dessous

Tableau 3: Protocole de traitement des souris selon les lots

	J0 Infection AnTat1/1E (1000 parasites)	J21 Suramine (20mg/kg IV)	J22 Mégazol	J23 Mégazol	J24 Mégazol	J25 Mégazol
80 mg/kg PO	✓	✓	✓	✓	✓	
60 mg/kg PO	✓	✓	✓	✓	✓	
40 mg/kg PO	✓	✓	✓	✓	✓	
20 mg/kg PO	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10 mg/kg PO	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Témoins infectés sans traitement	✓					
Témoins sans infections et sans traitement						

Le traitement débute au 21^{ème} jour post infection, pour être sûr du caractère neurologique de l'infection (Bouteille *et al*, 1987 ; 1988 (les 2) ; 1990 et 1998).

Il consiste en une première dose unique de Suramine à 20 mg/kg le premier jour, puis à la même heure le jour suivant la première dose de Mégazol (de 80 à 10 mg/kg selon le groupe) et ainsi de suite

chaque jour pour un total de 3 doses de Mégazol pour les groupes à 80, 60 et 40 mg/kg et de 4 doses pour les groupes à 20 et 10 mg/kg.

Pour le gavage, les souris étaient maintenues en extension la gueule ouverte pour permettre l'introduction de la canule de gavage reliée à une seringue de 1 mL. La suspension jaune a été administrée en une dose unique par jour (volume de 50 µL pour éviter les régurgitations).

Nous avons fixé le terme de cette étude à 200 jours après quoi les souris ont été euthanasiées selon les protocoles d'euthanasies en vigueur.

Toutes les manipulations ont été effectuées en conformité avec les recommandations nationales et internationales actuelles sur l'expérimentation animale. L'étude a été approuvée au Comité Régional d'Éthique sur l'Expérimentation Animale du Limousin (CREEAL) au numéro 4-07-2012.

4.1.5. Matériel thérapeutique

La Suramine (Sigma-Aldrich, St Louis ; USA) a été diluée dans de l'eau physiologique et a été injectée en intra péritonéale dans un volume de 200 µL.

Le Mégazol, ou CL 64 855 (American Cyanamid) ou 2-amino-5-[1-méthyl-5-nitro-2-imidazolyl]-1,3,4-thiadazole, a été gracieusement synthétisé et fourni par le Dr Bernard Morvan (βios Chemicals) en suivant le schéma de synthèse déjà décrit dans une précédente publication (Chauvière *et al*, 2003). Il se présente sous la forme d'une poudre jaune non soluble dans l'eau, mais soluble dans le DMSO. Le Mégazol a été administré *per os* avec une canule de gavage adaptée dans une suspension de CarboxyMethylCellulose, (Sigma-Aldrich, Steinheim ; Germany) faible viscosité à 2%, à raison de 50 µL par dose.

4.1.6. Prélèvement et recueil de données

Pour déterminer les heures de prélèvement des urines nous avons utilisé l'étude pharmacocinétique d'Enanga *et al*, (1999). En effet grâce à du Mégazol tritié (Chauvière *et al*, 1998) il a été déterminé que la demi-vie du Mégazol était de 3h chez la souris préalablement traitée par Suramine 24h auparavant (contre 0,7h sans Suramine).

Nous avons fait les prélèvements plasmatiques 3h après la première et la dernière administration de chaque lot consistant en un prélèvement sanguin par ponction du sinus rétro orbital des souris puis récupération du plasma après centrifugation.

Pour les urines nous avons effectué les prélèvements à partir de 3h après la première dose, sur une durée de prélèvement de 12h ; puis sur une durée de 24h, trois heures après la dernière dose. Les

prélèvements d'urines ont été effectués grâce à des cages à métabolismes, (Tecniplast® Italie) gracieusement mises à disposition par le service de physiologie de la faculté de pharmacie de Limoges.

La masse des souris a également été recueillie chaque semaine ainsi que la parasitémie qui elle a été comptée sur cellule de Malassez tous les 5 jours pendant les 2 premiers mois puis toutes les semaines par la suite.

4.1.7. Analyses statistiques

Les résultats des variables quantitatives sont présentés sous la forme moyenne \pm écart-type, minimum, maximum et médiane. Les résultats des variables qualitatives sont exprimés en fréquences et pourcentages. Les comparaisons de variables qualitatives entre deux groupes de sujets ont été réalisées par des tests du Chi² ou des tests exacts de Fisher en fonction des effectifs théoriques et du nombre de classes dans les variables considérées. Les distributions des variables quantitatives (suivi *versus* doses) ont été comparées par un test t de Kruskal-Wallis. Des courbes de survie pour les différentes doses ont été tracées selon la méthode de Kaplan-Meier et comparées entre elles à l'aide de tests de log-rank.

Le seuil de significativité choisi pour l'ensemble des analyses statistiques est de 0,05. Le logiciel utilisé est SAS 9.1.3 (SAS Institute, Cary, USA).

4.2. Recherche de Métabolites

4.2.1. Test de solubilité du Mégazol et choix du solvant d'extraction

Que ce soit pour l'incubation par microsomes hépatiques ou pour l'extraction avant une HPLC, le choix du solvant est essentiel. Pour cela, nous avons mis en œuvre toute une batterie de tests de solubilité avec divers solvants. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Tests de solubilité du Mégazol dans différents solvants (DMSO = DiMethylSulfOxyde ; NaOH= soude ; HCl= Acide Chlorhydrique ; H₂SO₄ = Acide Sulfurique ; ACN = ACétoNitrile)

Solvant	Solubilité					
	---	--	-	+	++	+++
DMSO						✓
Eau		✓				
Eau + NaOH (1M)			✓			
Eau + HCl (1N)	✓					
Acétate d'Ethyl				✓		
Dichlorométhane				✓		
Butan-1-ol					✓	
Butan-2-ol					✓	
Ethanol				✓		
Ether		✓				
Toluène		✓				
Chloroforme			✓			
Acétone					✓	
Isopropanol				✓		
Eau + H ₂ SO ₄ (2N)	✓					
Méthanol	✓					
ACN				✓		
Eau + 2% DMSO		✓				
ACN + 2% DMSO			✓			
ACN / DMSO (50/50)						✓

Suite à ces tests nous avons sélectionné le mélange ACN/DMSO (50/50) pour l'incubation par microsomes hépatiques.

Pour ce qui est de l'extraction, nous sommes partis de l'extraction utilisée par Enanga *et al*, (1997) qui se servaient essentiellement du dichlorométhane. Puis, après ses tests de solubilité, nous avons comparé les quantités de métabolites obtenues pour un même échantillon d'urine, avec les extractions utilisant le Dichlorométhane et le Butan-2-ol. Ce dernier est plus efficace ; il a donc été utilisé dans la suite de notre étude.

4.2.2. Incubation du Mégazol par des microsomes hépatiques humains

Les microsomes hépatiques ont été fournis par la société Biopredic International (Rennes, France). Il s'agit d'un pool de plusieurs foies humains (ici 55 foies). Le pool de microsomes hépatiques était à la concentration de 36,14 mg/mL.

Pour utiliser le Mégazol nous avons préparé une solution mère de Mégazol à 9 g/L dans un mélange ACN/DMSO (50/50).

La réaction consiste à mettre en solution dans un volume final de 200 μ L, les éléments suivants :

- ✓ Tampon incubation : TRIS-HCL 0,1 M et MgCl₂ 10 mM (pH 7,4 à 37°)
- ✓ Microsomes hépatiques humains à 0,5 mg/mL
- ✓ Substrat : Solution de Mégazol à 100 et 500 μ M

Le tout subit une pré-incubation à 37°C (Gilson Temperature Regulator 832 et Thermostatic Rack ; Middleton, USA) pendant 5 minutes. Puis, la réaction démarre avec l'ajout du co-substrat.

- ✓ Co-substrat : NADPH à 2 mM

Nous avons alors mis à incuber l'ensemble à 37°C pendant 60 minutes.

La réaction a finalement été stoppée par l'ajout d'une solution « STOP » d'Acétonitrile (100 μ L). Les échantillons ont par la suite été centrifugés 5 minutes à 13 000 tours/minute et le surnageant a été pipeté et mis à -20°C.

Des incubations contrôles sans microsomes ont été faites dans le même temps.

4.2.3. Extractions

4.2.3.1. Extraction pour la méthode GUS (General Unknown Screening)

L'extraction retenue pour cette étude est une optimisation de celle utilisée par Enanga *et al*, 1997,1999 et 2000 dans laquelle était utilisé le dichlorométhane comme solvant d'extraction. Nous avons ici, adopté le butan-2-ol comme solvant d'extraction car ce dernier permet d'extraire plus de métabolites que le dichlorométhane qui lui avait été choisi à l'époque pour doser principalement le Mégazol.

Il s'agit d'une extraction double (basique puis acide). Cent microlitres d'urines ou de plasma sont disposés dans un tube en verre avec bouchon hermétique, puis mis en contact et vortexés avec 20 μ L de NaOH (1N, AVS Titrinorm® ; Fontenay-sous-Bois, France) puis laissés au repos durant 5 minutes. À ce mélange sont rajoutés 5 mL de Butan-2-ol (Prolabo Rhone Poulenc ; Paris, France) et l'ensemble est

mis sous agitation rotatoire (25 tours/min ; 65° ; Rotator SB3, Stuart® ; Stone, Staffordshire, United Kingdom) pendant 20 minutes, puis centrifugé pendant 10 minutes à 3 500 tours/ min.

À la sortie de la centrifugeuse, il reste un liquide homogène, recueilli avec une pipette en verre (extrait alcalin), et un précipité.

Le précipité restant subit l'extraction acide. Soixante cinq microlitres d'HCl (1N ; AVS Titrim® ; Fontenay-sous-Bois, France) sont ajoutés puis vortexés et laissés au repos 5 minutes. Puis, comme précédemment, 5 mL de Butan-2-ol sont rajoutés et le tout est mis sous agitation rotatoire pendant 20 minutes, centrifugé 10 minutes, et la partie non précipitée (extrait acide) transférée.

Par la suite, les extraits alcalins et acides sont mélangés et mis à évaporation au Speed-Vac® (Thermo-Fisher ; Les Ulis, France) pour obtenir des extraits secs. Ces derniers sont reconstitués dans 100 µL de 50:50 de Méthanol / 0,1% acide acétique dans l'eau au vortex juste avant analyse HPLC/MS (Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse).

4.2.3.2. Extraction pour la méthode MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Il s'agit de la même extraction que précédemment à ceci près que 20 µL d'étalon interne (Métronidazole à 25 ng /µL) ont été ajoutés et vortexés aux 100 µL d'échantillons initiaux (urine, plasma, incubation par microsomes hépatiques).

4.2.4. Analyses HPLC/MS

4.2.4.1. Chromatographie liquide en phase inverse

Les solvants et réactifs utilisés pour la spectrométrie de masse sont de qualité LC-MS (Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse). Le méthanol et l'acide acétique proviennent de Sigma-Aldrich® (Saint Quentin Fallavier, France).

Le système HPLC consiste en une pompe Shimadzu LC 10 ADvp (Japon) avec un auto-injecteur SIL-Ht et un four CTO-10ASvp. La séparation chromatographique a été réalisée :

- ✓ sur une colonne Nucleosil C18 (125 x 2,1mm i.d, 100Å-5µm) (Macherey-Nagel) à un débit de 0,2 mL/min.
- ✓ Solvant A : Eau / 0,1% CH₃COOH
- ✓ Solvant B : Méthanol / 0,1% CH₃COOH

- ✓ L'élution est réalisée comme suit :
équilibration à 5% de solvant B,
augmentation à 50% de B en 19 min,
suivi d'une augmentation à 100% de B
en 1,5 min, 100% de B maintenu
pendant 2,5 min, enfin diminution à 5%
de B en 30 sec et rééquilibration de la
colonne pendant 10 min (illustration du
profil d'élution : figure 27).

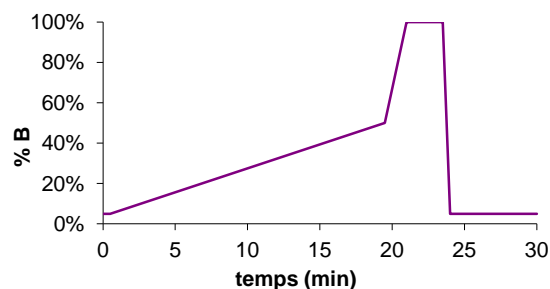


Figure 27 : Profil d'élution utilisé pour la méthode MRM

Pour les extraits d'urine en MRM, un volume de 3 μ L a été injecté. Pour ce qui est des extraits d'urine en GUS, de plasma et de l'incubation par microsomes hépatiques en MRM, il a été injecté le volume maximum de 20 μ L. En effet, la méthode ayant été mise au point pour l'urine où les métabolites étaient présents en quantités bien supérieures, il fallait augmenter les chances de détection des métabolites en augmentant le volume des échantillons faiblement concentrés.

4.2.4.2. Spectrométrie de Masse

La détection est effectuée par un spectromètre de masse hybride triple quadrupole / trappe d'ions linéaire 4000 Q-TRAP® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) équipé d'une source d'ionisation Electrospray turbo Ion Spray (ESI) et contrôlé par le logiciel Analyst 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les paramètres d'ionisation ont été optimisés en infusant une solution de Mégazol à 10 μ g/ml en modes positif et négatif. L'ionisation optimale est effectuée en mode positif avec les paramètres suivants :

- ✓ voltage Ion Spray (IS), 5 500 V
- ✓ curtain gas, 15 unités arbitraires
- ✓ ion source gas 1 et 2, respectivement 20 et 30 unités
- ✓ Collision cell eXit Potential (CXP), 16 V
- ✓ Declustering Potential (DP), 46 V
- ✓ Gaz de collision : azote

4.2.4.3. Méthode GUS

La méthode GUS (Sauvage *et al*, 2006) en elle-même, ou General Unknown Screening que l'on pourrait traduire par « méthode par balayage large » consiste à détecter et identifier les composés exogènes dans les matrices biologiques. Concrètement cela équivaut à éliminer les molécules d'un échantillon qui sont retrouvées dans le blanc, ainsi, cette méthode permet de cribler un ensemble très complet et complexe de molécules. Il reste ensuite à déterminer lesquelles sont réellement intéressantes parmi celles qui ressortent du bruit de fond.

L'acquisition est réalisée en mode IDA (Information-Dependent Acquisition) : le spectromètre de masse alterne en continu entre un survey scan en mode Enhanced MS (scan MS avec accumulation des ions dans la trappe linéaire) et un à trois dépendant scan en mode EPI (Enhanced Product Ion scan) : les 3 ions les plus intenses de chaque spectre EMS (Enhanced Mass Spectrometry) sont sélectionnés comme ions parents (sans autres critères de sélection), et sont fragmentés en EPI ou ions produits (Collision Energy (CE), 40 V ; Collision Energy Spread (CES), 25 V). Chaque ion peut être sélectionné pour un maximum de 4 occurrences ; les ions sélectionnés 4 fois sont ensuite exclus pendant 15 secondes.

Pour chaque spectre EPI acquis, une comparaison des signaux extraits pour cette masse a été réalisée entre l'extrait témoin (0 mg/kg de Mégazol) et l'extrait 80 mg/kg de Mégazol. Les ions présents uniquement dans l'extrait 80 mg/kg sont sélectionnés en tant que métabolites potentiels et intégrés dans la méthode MRM.

4.2.4.4. Spécificités de la méthode MRM

La méthode de « Selected Reaction Monitoring » (SRM) ou « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) est une technique de spectrométrie de masse permettant de quantifier une ou plusieurs molécules cibles dans un échantillon biologique complexe (AFSSAPS, 2012). Ce protocole analytique consiste, d'après les résultats de la méthode GUS utilisée au préalable, à faire le choix d'une sélection d'« ions produits » spécifiquement retrouvés dans le profil de fragmentation de chaque « ion précurseur » d'intérêt. Une illustration explicative de cette méthode est présentée en la figure 28.

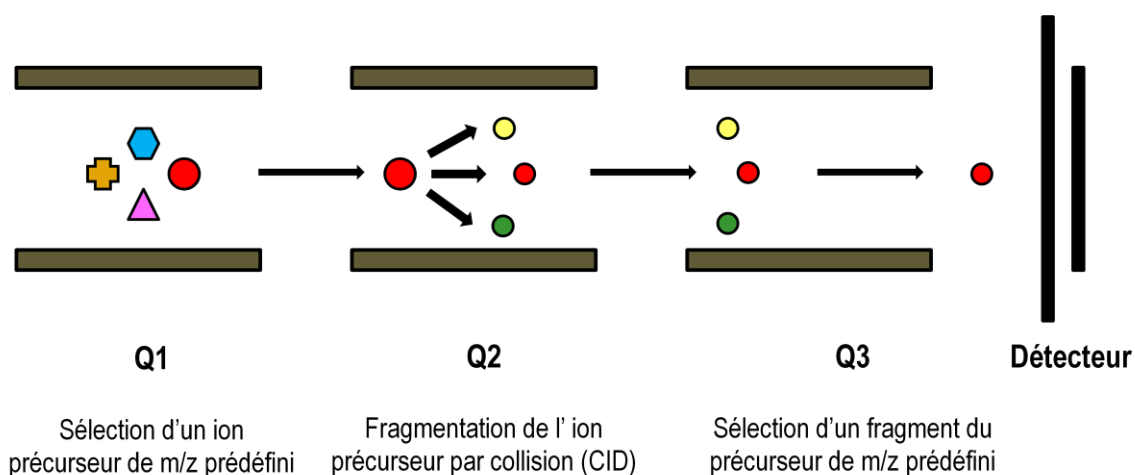


Figure 28 : Illustration du principe de l'analyse MRM ; (AFSSAPS, 2012)

Un spectromètre de masse mesure le rapport masse atomique/charge élémentaire (m/z) de molécules ionisées. Dans le cas de la méthode MRM, l'analyse inclut deux étapes de sélection d'ions de m/z prédéfinis. Lors de la première étape, un ion précurseur de m/z prédéfini est sélectionné dans le premier quadrupole de l'instrument (Q1). Cet ion est ensuite fragmenté dans le second quadrupole (Q2 ou cellule de collision) par collision avec un gaz (CID : Collision-Induced Dissociation). Enfin, un fragment spécifique de l'ion précurseur, de m/z prédéfini, est sélectionné dans le troisième quadrupole (Q3). C'est l'intensité du signal généré par ce fragment qui est détectée et utilisée pour la quantification de la molécule analysée.

La spécificité analytique de la méthode MRM est conférée par la combinaison de la valeur de m/z (rapport de la masse atomique m sur la charge élémentaire z d'un ion) de la molécule à doser (précurseur) et de la valeur de m/z du fragment détecté. L'ensemble de ces deux paramètres, censés être spécifiques de la molécule à doser, est appelé une « transition » (ou couple de masse Q1/Q3). Ces valeurs ont été définies avant l'analyse et sont utilisées pour paramétrer le spectromètre de masse (AFSSAPS, 2012).

Pour chaque métabolite d'intérêt recherché, nous avons utilisé 2 à 3 transitions définies par plusieurs paramètres :

- ✓ Le temps de scan
- ✓ Le DP
- ✓ L'EP (Entrance Potential)
- ✓ Le CXP
- ✓ La CE

Parmi tous ces paramètres, seule varie l'énergie de collision appliquée pour leur fragmentation, à chaque ion parent (optimisée pour le Mégazol et le Métronidazole, fixée à 30 ou 50 eV pour les autres métabolites). Les paramètres MRM pour chaque analyte sont indiqués dans le tableau 5. Les paramètres du Mégazol et du Métronidazole ont été optimisés à partir d'infusion à 10 $\mu\text{g/mL}$ et 1 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Pour les autres analytes, l'énergie de collision a été arbitrairement fixée à 35 eV, sauf

pour certaines transitions peu intenses qui nécessitaient une énergie de collision à 50 eV. Un chromatogramme LC/MS/MS (chromatographie liquide couplé la spectrométrie de masse en tandem) représentatif comprenant toutes les transitions choisies est présenté dans la Figure 29.

Une méthode d'interprétation des spectres a été définie pour automatiser la détection et le calcul de l'aire de chaque pic d'intérêt. Ces valeurs d'aires sont ensuite normalisées par rapport à l'aire du pic de la transition 172 → 128 du Métronidazole.

Tableau 5 : Paramètres SM (de Spectrométrie de Masse) de chaque analyte, transitions utilisées pour chaque analyte, et énergie de collision utilisée (eV)

<i>Analyte</i>	<i>Transition MRM (m/z)</i>	<i>CE* (eV)</i>
Métronidazole	172 → 128	21
Métronidazole	172 → 98	50
Métronidazole	172 → 82	35
Mégazol	227 → 181	27
Mégazol	227 → 197	25
Mégazol	227 → 154	31
ion 213 à 14 min	213 → 196	35
ion 213 à 14 min	213 → 167	35
ion 213 à 14 min	213 → 127	35
ion 243 à 8,9 min	243 → 226	35
ion 243 à 8,9 min	243 → 168	35
ion 243 à 8,9 min	243 → 141	35
ion 243 à 12,2 min	243 → 184	50
ion 243 à 12,2 min	243 → 127	50
ion 243 à 12,2 min	243 → 114	50
ion 243 à 15,1 min	243 → 228	35
ion 243 à 15,1 min	243 → 213	35
ion 243 à 15,1 min	243 → 157	35
ion 403 à 6,7 et 12,5 min	403 → 181	50
ion 403 à 6,7 et 12,5 min	403 → 269	35
ion 403 à 6,7 et 12,5 min	403 → 227	35
ion 419 à 12,2 et 14,9 min	419 → 157	50
ion 419 à 12,2 et 14,9 min	419 → 243	35
ion 419 à 12,2 et 14,9 min	419 → 170	35
ion 239 à 10,9 min	239 → 197	35
ion 239 à 10,9 min	239 → 141	35
ion 239 à 10,9 min	239 → 123	35
ion 316 à 10,3 min	316 → 229	35
ion 316 à 10,3 min	316 → 196	35
ion 316 à 10,3 min	316 → 141	35
ion 358 à 13,1 min	358 → 141	50
ion 358 à 13,1 min	358 → 229	35
ion 358 à 13,1 min	358 → 196	50
ion 343 à 15,4 et 17,5 min	343 → 214	35
ion 343 à 15,4 et 17,5 min	343 → 140	50

* Collision Energy.

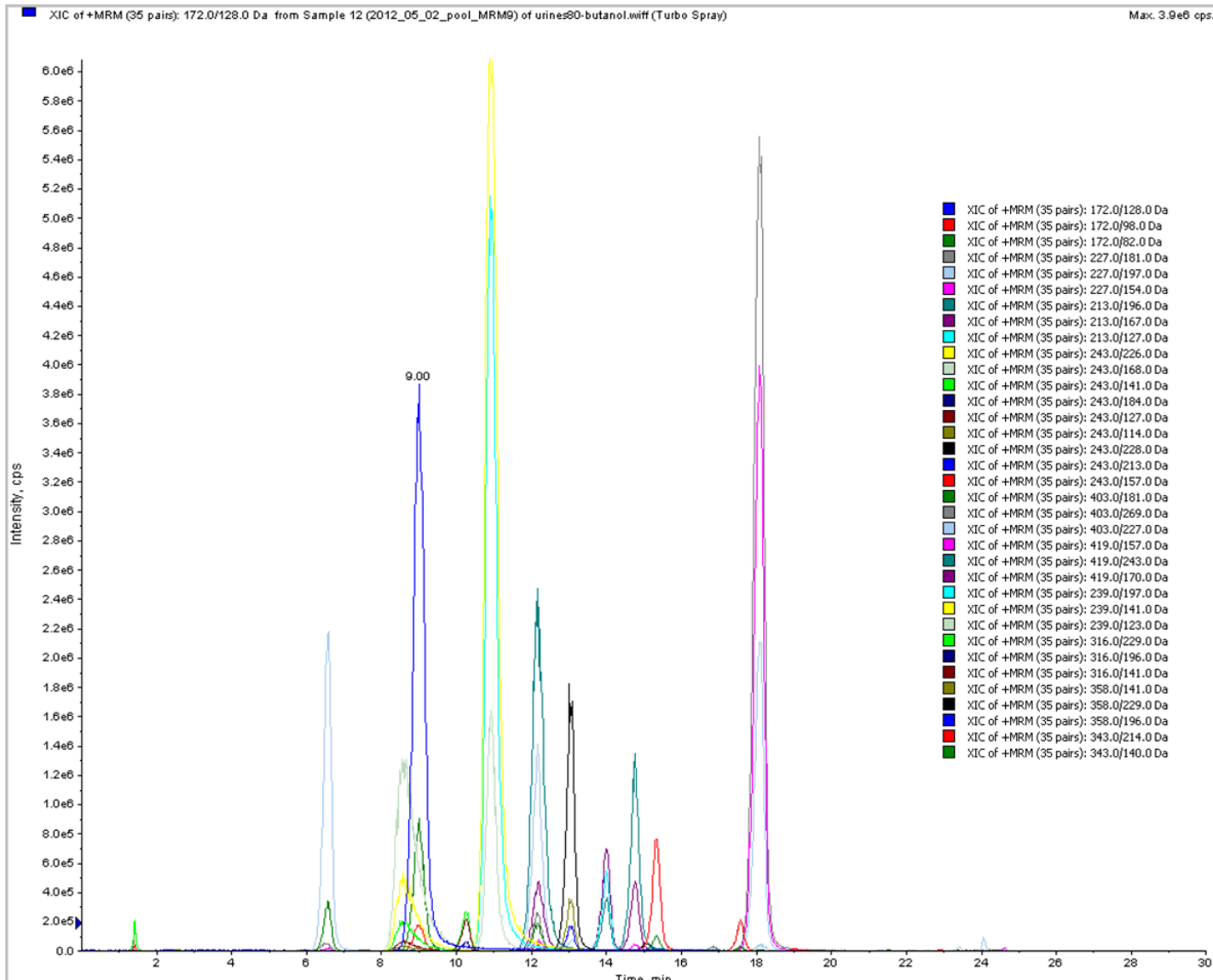


Figure 29 : Spectre MRM d'un échantillon d'urine de souris traitées.

Injection de l'extraction test au butanol des urines du lot à 80 mg/kg de Mégazol : chaque couleur correspond à une transition (indiquée sur le spectre par les carrés de couleur), tous les signaux sont superposés. Il est possible de les extraire du graphe séparément pour n'afficher que les 2-3 transitions d'une molécule et améliorer l'interprétation. (Exemple figure suivante)

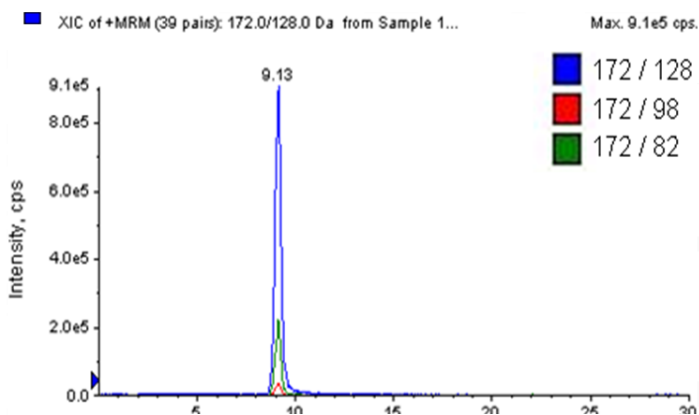


Figure 30 : Exemple d'extraction de courbes pour le Métronidazole

On obtient un pic par transition avec le même temps de rétention pour toutes les 3 : c'est la situation idéale, les transitions choisies sont spécifiques du Métronidazole, les pics sont fins et facilement intégrables pour obtenir l'aire sous chaque pic

5. Résultats

5.1. Expérimentation animale

5.1.1. Résultats généraux

Au bout de 7 jours post infection, nous avons commencé à évaluer la parasitémie sur tous les lots de souris. Les parasitémies suivantes (tous les 5 jours, voir figure 31) ont permis de suivre l'évolution de la parasitémie, mais dans chaque lot, sur 11 souris infectées, toutes n'étaient pas parasitées. Les nombres et les pourcentages de souris réellement parasitées et non parasitées sont représentés dans le tableau 6.

De plus, durant l'expérimentation animale, certaines des souris ont réussi à s'échapper, en raison de l'utilisation de cages non adaptées à l'hébergement des souris. Il y a eu également des pertes expérimentales, lors de manipulations et notamment au moment du prélèvement sanguin assez invasif par ponction du sinus rétro orbital des souris. Ces pertes expérimentales sont également représentées dans le tableau 6.

Il est évident que pour notre étude, ces souris non parasitées, et ces pertes lors de manipulation, ne pouvaient plus apparaître dans nos analyses. Ces souris ont donc constitué, un ensemble de souris non exploitables (tableau 6) pour cette étude. Par conséquent, l'effectif global de départ (11 souris par lot) a diminué aléatoirement en fonction de ces deux paramètres, en donnant au final, un nouvel effectif, toujours exploitable, mais de puissance statistique plus faible.

En ce qui concerne les masses moyennes des souris au cours de l'expérimentation, représentées dans la figure 31 nous pouvons observer une légère chute dès le début du traitement (J21) chez tous les groupes traités, seuls les groupes témoins, infectés et non infectés, n'ayant pas reçu de Mégazol continuent à prendre du poids durant cette période. Après traitement, les témoins infectés ont une masse moyenne plus faible que pour les autres groupes traités qui eux reprennent du poids.

Tableau 6 : Résultats généraux de l'expérimentation animale (NT= souris non traitées ; T inf+ NT = groupe témoin de souris infectées mais non traitées ; T inf- NT = groupe témoin de souris non infectées et non traitées)

Lot	Souris infectées	Souris réellement parasitées	Souris non exploitables		Souris : Effectif exploitable	Souris traitées et indemnes de parasite (200 jours)	Souris traitées : rechutes
			Souris non parasitées	Pertes : expérimentales + échappées			
80 mg/kg	11 (100%)	6 (55%)	5 (45%)	0 (0%)	6 (55%)	4 (67%)	2 (33%)
60 mg/kg	11 (100%)	10 (91%)	1 (9%)	1 (9%)	9 (90%)	9 (100%)	0 (0%)
40 mg/kg	11 (100%)	6 (55%)	5 (45%)	0 (0%)	6 (55%)	5 (83%)	1 (17%)
20 mg/kg	11 (100%)	10 (91%)	1 (9%)	2 (18%)	8 (89%)	7 (88%)	1 (12%)
10 mg/kg	11 (100%)	9 (82%)	2 (18%)	1 (9%)	8 (80%)	2 (25%)	6 (75%)
T inf+ NT	11 (100%)	6 (55%)	5 (45%)	0 (0%)	6 (55%)	-	-
T inf- NT	0 (0%)	0 (0%)	-	0 (0%)	11 (100%)	-	-

Suivi de la masse moyenne des souris par lot

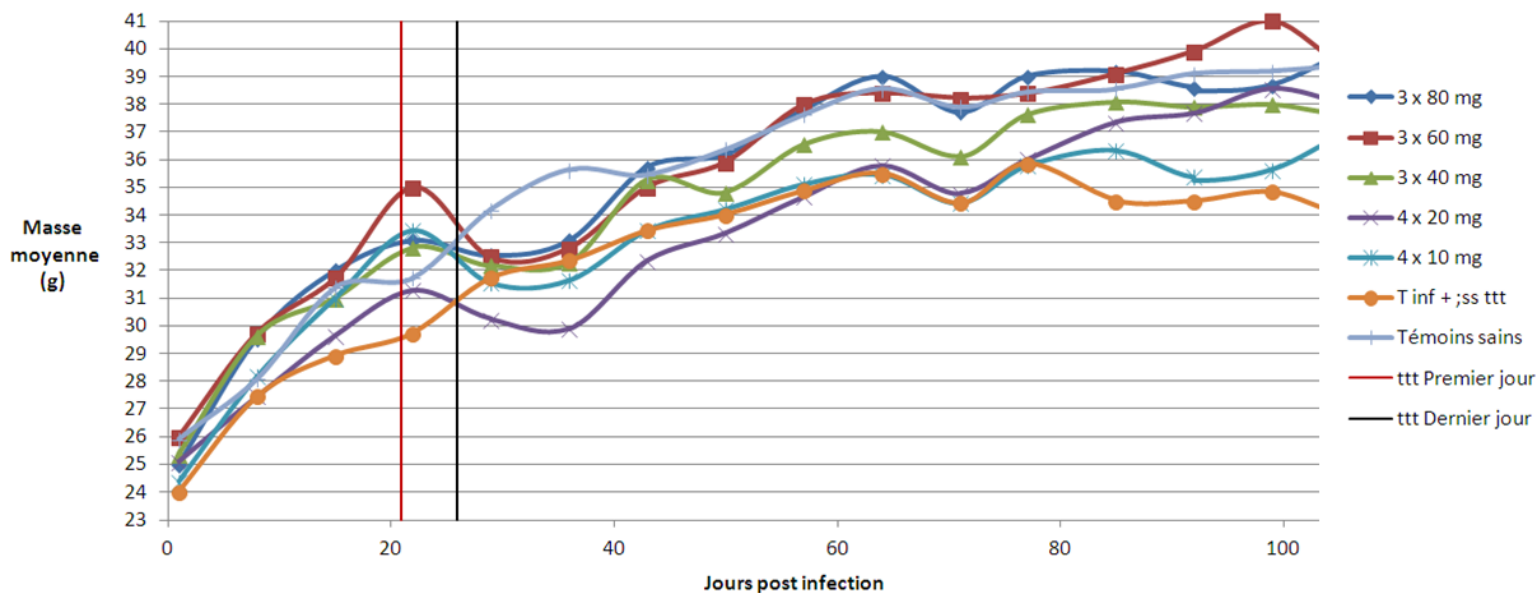


Figure 31 : Suivi de la masse moyenne des souris par lot.

Les masses moyennes sont présentées pour un lot complet de 11 animaux. Il n'y a pas eu de distinction entre souris exploitables et non exploitables, La représentation des masses moyennes a été limitée à 100 jours post infection, car nous n'avons pas noté de différences significatives entre les groupes au delà de cette limite

Suivi de la parasitémie par lot

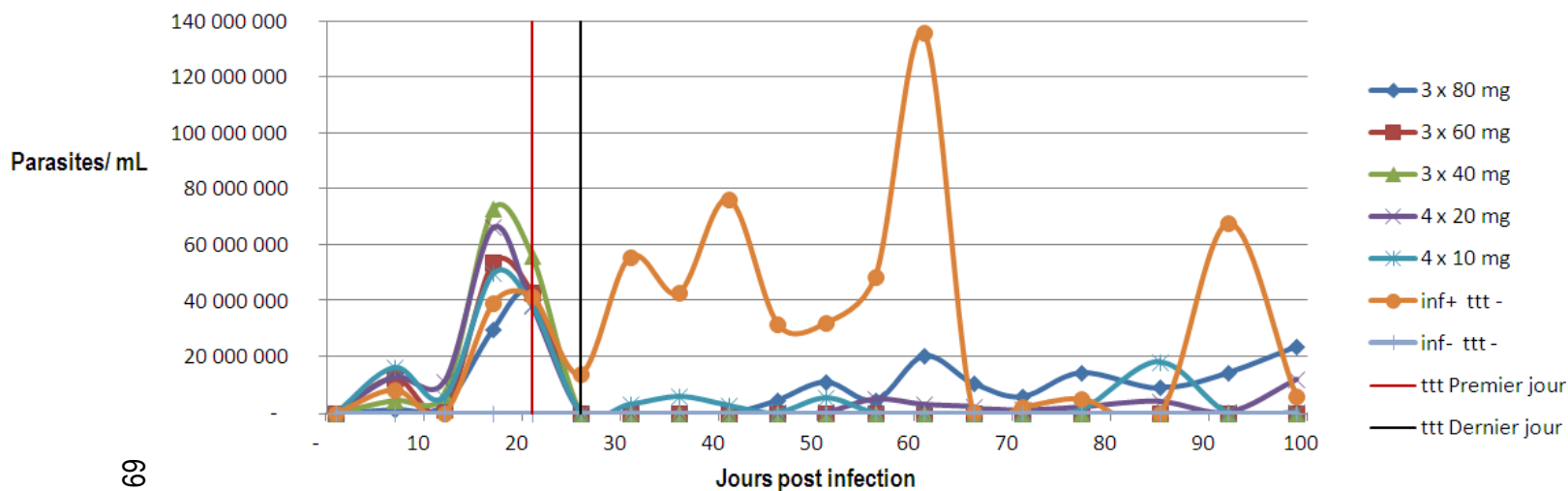


Figure 32 : Suivi de la parasitémie moyenne par lot de souris.

(Uniquement sur les souris réellement parasitées). La représentation des suivis de la parasitémie a été limitée à 100 jours post infection, car nous n'avons pas noté de résultats significatifs au delà de cette limite.

De manière générale, parmi les groupes infectés puis traités, seul le lot à 60 mg/kg est resté indemne de rechute. Le lot de souris traité à 80 mg/kg a subi deux pertes.

L'efficacité du Mégazol est illustrée par la figure 32 avec les courbes de parasitémie de tous les lots infectés et traités qui présentent une parasitémie nulle à la fin du traitement, alors que le lot témoin, infecté et sans traitement, voit sa parasitémie augmenter.

Les rechutes sont visibles avec la résurgence de parasitémies positives après le traitement. Ces premières rechutes apparaissent dès 6 jours après le traitement pour le lot à 10 mg/kg puis 22 jours après la dernière dose pour le lot à 80 mg/kg, puis 26 jours pour le lot à 20 mg/kg, enfin la rechute la plus tardive est celle du lot à 40 mg/kg 119 jours après la dernière dose administrée.

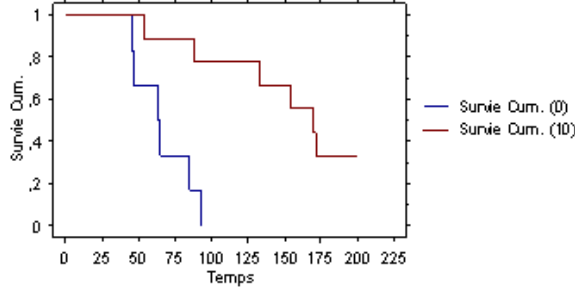
La différence entre les délais de rechutes après traitement va de 6 jours après traitement chez le groupe traité à 10 mg/kg à 119 jours pour le groupe traité à 40 mg/kg.

Certaines rechutes sont visibles grâce aux courbes de parasitémie de la figure 32 qui augmentent progressivement (lots à 10 mg/kg, 20 mg/kg ...).

5.1.2. Résultats statistiques

Sur la page suivante est présentée la figure 33 illustrant les graphes de survie de chacun des lots, comparés au lot témoin.

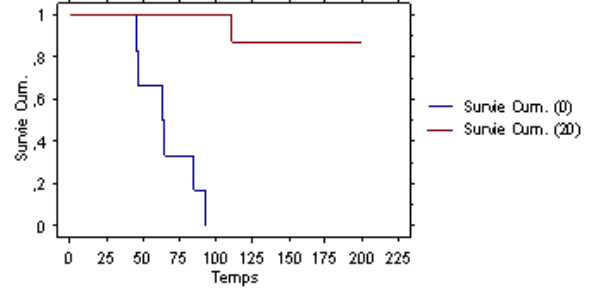
Kaplan-Meier Graphe de Survie Cum. pour Suivi
 Variable censure : DC
 Facteur : Dose
 Critère d'inclusion : Dose 0 vs 10 de Base à traite 21mai (importé).swd



Logrank (Mantel-Cox) Test pour Suivi
 Variable censure : DC
 Facteur : Dose
 Critère d'inclusion : Dose 0 vs 10 de Base à traite 21mai (importé).swd

Chi-2	DDL	P
10,30	1	,0013

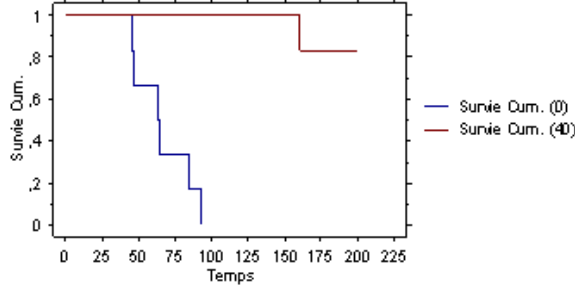
Kaplan-Meier Graphe de Survie Cum. pour Suivi
 Variable censure : DC
 Facteur : Dose
 Critère d'inclusion : Dose 0 vs 20 de Base à traite 21mai (importé).swd



Logrank (Mantel-Cox) Test pour Suivi
 Variable censure : DC
 Facteur : Dose
 Critère d'inclusion : Dose 0 vs 20 de Base à traite 21mai (importé).swd

Chi-2	DDL	P
15,70	1	<,0001

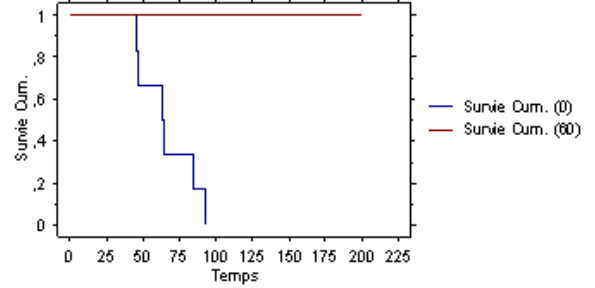
Kaplan-Meier Graphe de Survie Cum. pour Suivi
 Variable censure : DC
 Facteur : Dose
 Critère d'inclusion : Dose 0 vs 40 de Base à traite 21mai (importé).swd



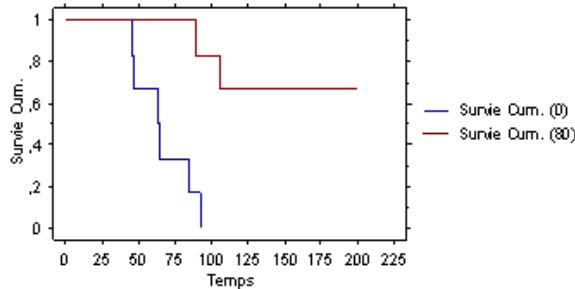
Logrank (Mantel-Cox) Test pour Suivi
 Variable censure : DC
 Facteur : Dose
 Critère d'inclusion : Dose 0 vs 40 de Base à traite 21mai (importé).swd

Chi-2	DDL	P
12,09	1	,0005

Kaplan-Meier Graphe de Survie Cum. pour Suivi
 Variable censure : DC
 Facteur : Dose
 Critère d'inclusion : Dose 0 vs 60 de Base à traite 21mai (importé).swd



Kaplan-Meier Graphe de Survie Cum. pour Suivi
 Variable censure : DC
 Facteur : Dose
 Critère d'inclusion : Dose 0 vs 80 de Base à traite 21mai (importé).swd



Logrank (Mantel-Cox) Test pour Suivi
 Variable censure : DC
 Facteur : Dose
 Critère d'inclusion : Dose 0 vs 80 de Base à traite 21mai (importé).swd

Chi-2	DDL	P
9,99	1	,0016

Figure 33 : Graphe de survie comparé à la dose, avec la comparaison statistique correspondante en dessous.

Les comparaisons statistiques des survies des lots traités à celle du lot témoin infecté et non traité montrent une survie significativement plus élevée pour les groupes traités avec une valeur de p de 0,0013 pour le groupe traité à 10 mg/kg ; de 0,0016 pour le groupe traité à 80 mg/kg ; de 0,0005 pour le groupe traité à 40 mg/kg ; enfin la valeur la plus significative alors qu'il n'y a eu qu'un mort comme dans le groupe à 40 mg/kg, est obtenue pour le lot à 20 mg/kg avec une valeur de $p < 0,0001$. La différence de significativité est due au plus grand nombre de souris « exploitables » chez le groupe à 20 mg/kg.

Le lot à 60 mg/kg a le désavantage statistique de n'avoir subi aucune perte. La méthode statistique utilisée n'a donc pas pu être appliquée et ne donne aucune p value. On peut penser que cette valeur aurait été encore meilleure que celle correspondant au lot 20 mg/kg à 1 mort et 8 souris exploitables car le lot à 60 a lui, 0 mort et 9 souris exploitables.

Tableau 7 : Comparaison de la durée de suivi de chaque groupe entre eux

<i>Test PLSD (Protected Least Significant Difference) de Fisher pour Suivi Effet/Dose</i>				
<i>Niveau de significativité : 5%</i>				
	Diff. Moy.	Diff. Crit.	Valeur p	Significativité
T inf+NT/10 mg/kg	-86,06	37,11	<0,0001	S
T inf+NT/20 mg/kg	-122,71	38,02	<0,0001	S
T inf+NT/40 mg/kg	-127,17	40,65	<0,0001	S
T inf+NT/60 mg/kg	-133,83	37,11	<0,0001	S
T inf+NT/80 mg/kg	-99,67	40,65	<0,0001	S
10 mg/kg/20 mg/kg	-36,65	34,21	0,0364	S
10 mg/kg/40 mg/kg	-41,11	37,11	0,0308	S
10 mg/kg/60 mg/kg	-47,78	33,19	0,0059	S
10 mg/kg/80 mg/kg	-13,61	37,11	0,4623	
20 mg/kg/40 mg/kg	-4,46	38,02	0,8136	
20 mg/kg/60 mg/kg	-11,13	34,21	0,5143	
20 mg/kg/80 mg/kg	23,04	38,02	0,2275	
40 mg/kg/60 mg/kg	-6,67	37,11	0,7181	
40 mg/kg/80 mg/kg	27,50	40,65	0,1789	
60 mg/kg/80 mg/kg	37,17	37,11	0,0701	

Le tableau 7 illustre bien l'activité du Mégazol, avec une très forte significativité des résultats entre le groupe témoin, infecté et non traité, et tous les autres groupes ayant reçu le Mégazol ($p < 0,0001$).

Le tableau 7 met en évidence 3 dosages d'intérêts. En effet, les groupes traités aux doses de 20, 40 et 60 mg/kg de Mégazol ont également une survie significativement plus forte que le groupe lui-même traité à 10 mg/kg ($p < 0,05$).

5.2. Recherche de Métabolites

5.2.1. Méthode GUS

Cette méthode a permis de faire ressortir du bruit de fond, 14 ions, dont celui correspondant au Mégazol, ayant un intérêt potentiel pour la recherche des métabolites. Ces premiers ions ont été obtenus en comparant les urines obtenues avec les lots traités par Suramine et Mégazol au blanc correspondant à des urines de souris traitées uniquement par la Suramine (20 mg/kg).

Sur ces 14 ions, certains ont le même rapport m/z , mais ont des temps de rétention et des spectres de fragmentation différents. L'ensemble de ces informations sont dans le tableau 8.

Tableau 8 : Analytes exprimés sous la forme du rapport m/z , en fonction de leurs Temps de Rétention (TR) et identification. Ces données ont été obtenues à partir d'un échantillon d'urine (80 mg/kg) comparé à un blanc. (NI = Non Identifié)

m/z	TR (min)	Identification de l'analyte
172	9,1	Etalon interne Metronidazole
213	14,5	Déméthyl-Mégazol
227	18,6	Mégazol
239	11,1	NI mais hypothèses selon le spectre de fragmentation
243	8,9	Hydroxy Mégazol
243	12,2	Hydroxylamine Mégazol
243	15,1	Sulfoxy Mégazol
316	10,5	NI mais hypothèses selon le spectre de fragmentation
343	15,9	NI mais hypothèses selon le spectre de fragmentation
343	18,2	NI mais hypothèses selon le spectre de fragmentation
358	13,0	NI mais hypothèses selon le spectre de fragmentation
403	6,6	Incertain :
403	12,2	Mégazol-Glucuroné peut être 2 positions différentes
419	12,2	Mégazol Hydroxy-glucuroné sur l'amine
419	14,7	Mégazol Hydroxy-glucuroné sur l'hydroxyle

Pour les métabolites de phase 2 conjugués à un acide glucuronique deux cyclisations sont possibles, la conformation « pyranose » (cycle pyrannoïde à six sommets), forme privilégiée par rapport à la conformation « furannose » (cycle furannoïde à 5 sommets), dont le cycle est plus tendu.

Les ions correspondent aux métabolisations les plus courantes et simples (figures 34 à 41) :

- ✓ le 227 correspondant au Mégazol (Spectre en annexe 1)

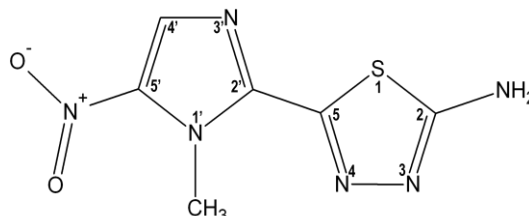


Figure 34 : m/z 227 Mégazol ; M (Masse molaire)=226

- ✓ le 213 dont le rapport m/z correspond à une perte de méthyle (Mégazol - CH₃ + H ou 227 - 15 + 1 = 213), il s'agit donc du Mégazol déméthylé qui serait un métabolite de phase 1 potentiel. (Spectre en annexe 2)

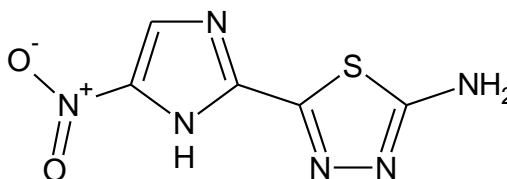


Figure 35 : m/z 213 Déméthyl-Mégazol ; M=212

- ✓ les deux 419 (métabolites de phase 2 potentiels) présents sous 2 isomères hydroxy glucuronés élués à des temps différents mais de spectres de fragmentation similaires. L'hypothèse de la glucurono-conjugaison vient de la perte -176 du spectre de fragmentation en annexe 3, qui correspond à une perte d'acide glucuronique, aboutissant à l'ion 243, métabolite retrouvé également.

- le premier élué (12,2 min) doit être l'hydroxy-Mégazol glucuroné sur l'amine laissant l'hydroxy libre et augmentant sa polarité et donc sa vitesse d'éluion.

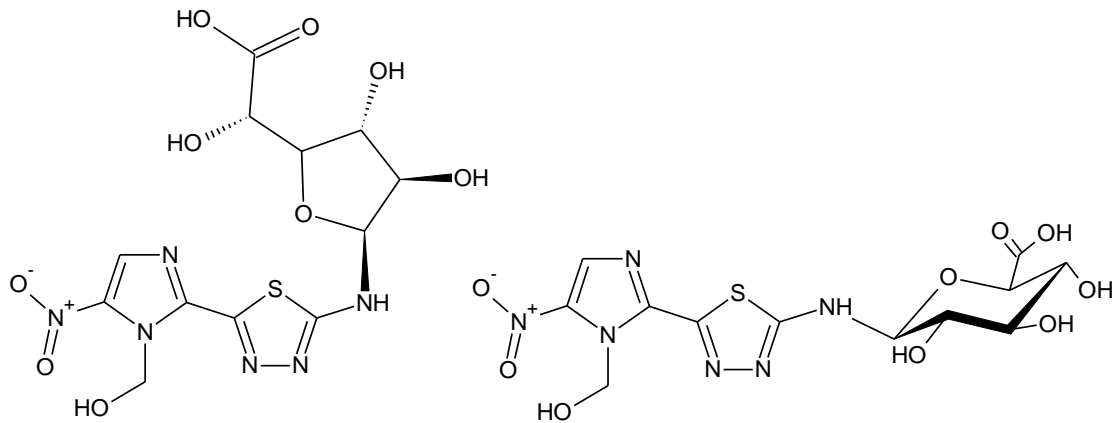


Figure 36 : *m/z* 419 Hydroxy-Mégazol glucuroné sur l'amine ;M=418

Gauche : 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxyméthyl-2-N-glucuronopyranosylmégazol

Droite : 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxyméthyl-2-N-glucuronofuranosylmégazol

- en second (17,7 min), vient l'hydroxy Mégazol glucuroné sur l'hydroxyle. Il est élué un peu plus tard, l'hydroxyle étant bloqué par l'acide glucuronique.

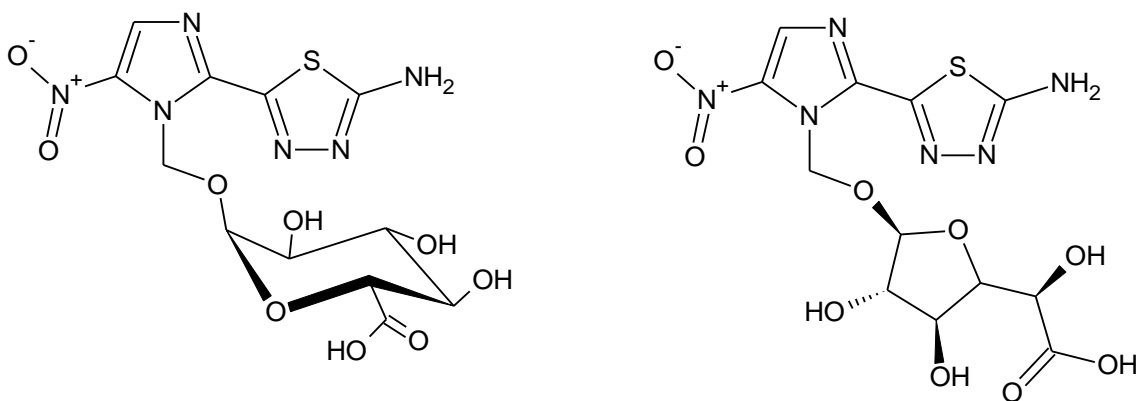


Figure 37 : *m/z* 419 Hydroxy Mégazol glucuroné sur l'hydroxyle ; M=418

Gauche : 1'-N-Glucuronopyranosyloxymégazol

Droite : 1'-N-Glucuronofuranosyloxymégazol

✓ les m/z 243, isomères oxygénés (métabolites de phase 1 potentiels) qui sont classés par hydrophilie relative dans cet ordre d'élution :

- l'hydroxy méthyle Mégazol : il serait le premier élué à 8,9 minutes. Il est le plus polaire des trois avec ses 2 sites hydrophiles distants ($-\text{CH}_2\text{OH}$; $-\text{NH}_2$).

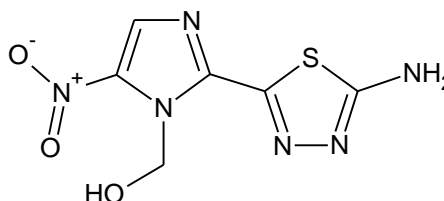


Figure 38 : m/z 243 Hydroxymégazol ; M=242

- l'hydroxylamine Mégazol : élué à 12,2 minutes de par sa polarité médiane due à ses deux sites hydrophiles juxtaposés ($-\text{NHOH}$).

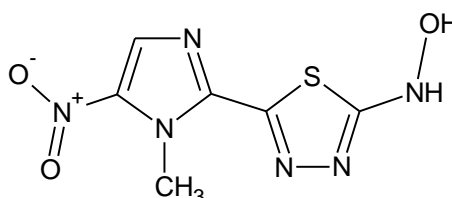


Figure 39 : m/z 243 Hydroxylamine Mégazol ; M=242

Ou 2-N-Hydroxymégazol

- le sulfoxy Mégazol : le dernier élué à 15,1 minutes, car le moins polaire des trois avec son seul site hydrophile ($-\text{NH}_2$).

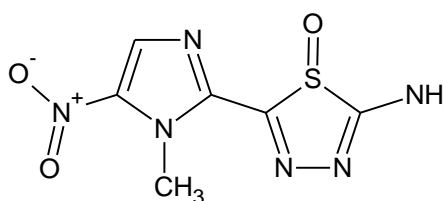


Figure 40 ; m/z 243 Sulfoxy Mégazol ; M=242

S-Oxymégazol

L'attribution des structures moléculaires, peut également se faire grâce à leurs fragmentations respectives (Voir spectres en Annexes, 4 ; 5 et 6). En effet, les premières pertes de masse pour chaque spectre sont de : -17 à 8,9 minutes soit une perte de NH_3 , possible avec les deux métabolites dont l'amine est libre (Hydroxy Mégazol et le Sulfoxy Mégazol) ; de -18 à 12,2 minutes, correspondant à une perte

de H₂O, possible chez les deux métabolites hydroxylés (Hydroxy Mégazol et Hydroxylamine Mégazol) ; de -15 à 15,1 minutes, correspondant à une perte de CH₃, déméthylation possible uniquement chez les deux métabolites au méthyle libre (Hydroxylamine Mégazol et le Sulfoxy Mégazol). En sachant que pour l'hydroxylamine Mégazol, la déshydratation est prioritaire sur la déméthylation, on retrouve les structures correspondantes aux pertes et aux temps de rétention correspondant par élimination.

- ✓ Les deux 403 dont seule l'hypothèse du Mégazol glucuroné sur l'amine parait possible (métabolite de phase 1). L'hypothèse de la glucurono-conjugaison vient de la perte -176 du spectre de fragmentation en annexe 7, qui correspond à une perte d'acide glucuronique, aboutissant à l'ion 227, le Mégazol.

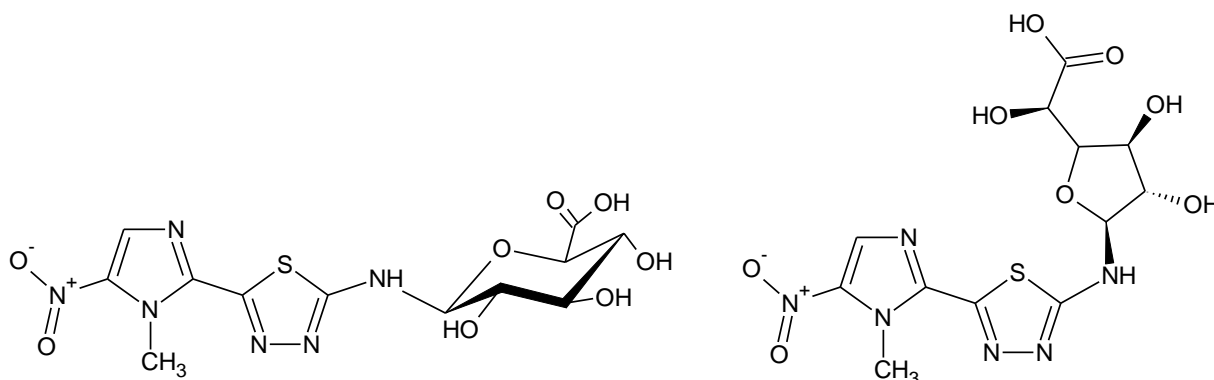


Figure 41 : *m/z* 403 Mégazol glucuroné sur l'amine ; *M*=402

Gauche : 2-*N*-Glucuronopyranosylmégazol

Droite : 2-*N*-Glucuronofuranosylmégazol

Les ions demeurant inconnus sont donc : un des deux 403, l'ion 239, l'ion 316, l'ion 358 et les deux ions 343 (15,9 et 18,2 min).

Cependant des hypothèses structurales peuvent être proposées selon, la parité massique des ions, en effet les ions de rapport m/z impairs possèdent un nombre pair d'azote et inversement, et selon les pertes de masse conduisant au squelette de base du Mégazol (tous les spectres sont présentés en annexe). Sur la base de ces deux constatations, la réflexion tient compte par la suite d'autres critères tels que le(s) site(s) de métabolisation, le(s) forme(s) de métabolisation, l'identification des pertes.

Ces hypothèses sont présentées ci-dessous (figures 42 à 45) :

- ✓ L'ion 239 (voir fragmentation en annexe 8)

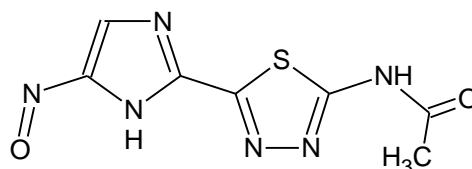


Figure 42 : Proposition de structure pour l'ion m/z 239 ; M=238
1'-N-Déméthyl-5'-N-déoxy-2-N-acétylmégazol

- ✓ L'ion 316 (voir fragmentation en annexe 9)

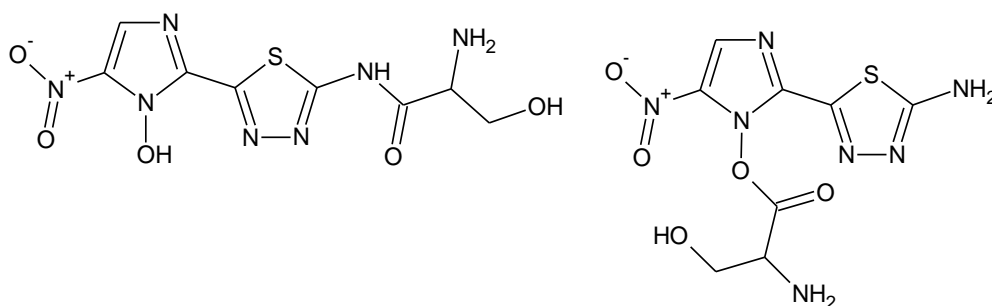


Figure 43 : Proposition de structure pour l'ion m/z 316 ; M=315
Gauche : 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxy-2-N-sérinemégazol ; Droite : 1'-N-Déméthyl-1'-N-sérinyloxymégazol

✓ L'ion 358 (voir fragmentation en annexe 10)

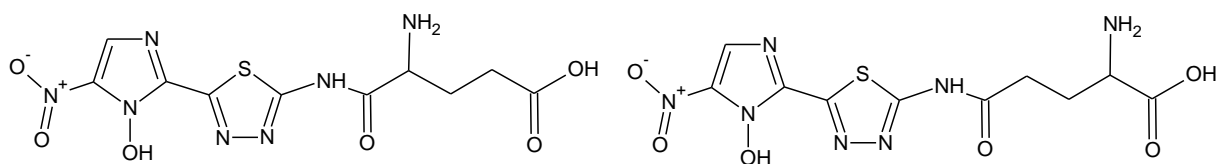


Figure 44 : Proposition de structure pour l'ion m/z 358 ; $M=357$

Gauche : 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxy-2-N-(1-glutamyl)mégazol

Droite : 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxy-2-N-(5-glutamyl)mégazol

✓ Les ions 343 (voir fragmentation en annexe 11)

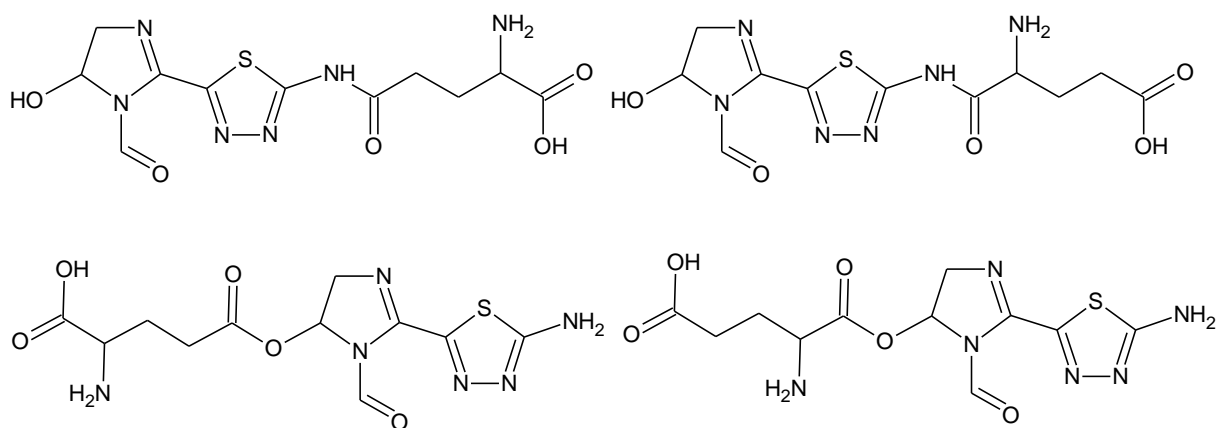


Figure 45 : Proposition de structures pour les ions m/z 343 ; $M=342$

Haut gauche : 1'-N-Déméthyl-1'-N-formyl-4',5'-N-dihydro-5-dénitro-5-hydroxy-2-N-(5-glutamyl)mégazol

Haut droite : 1'-N-Déméthyl-1'-N-formyl-4',5'-N-dihydro-5-dénitro-5-hydroxy-2-N-(1-glutamyl)mégazol

Bas gauche : 1'-N-Déméthyl-1'-N-formyl-4',5'-N-dihydro-5-dénitro-5-(5-glutamyl)oxy)mégazol

Bas droite : 1'-N-Déméthyl-1'-N-formyl-4',5'-N-dihydro-5-dénitro-5-(1-glutamyl)oxy)mégazol

Lors de la mise au point de la technique nous avons effectué les premiers essais sur les urines issues du lot le plus fortement dosé (80 mg/kg) pour détecter le plus de métabolites possible et en séparant l'extrait basique et acide. Nous avons, lors des analyses, pu obtenir des résultats reflétant l'abondance relative de certains métabolites par rapport au Mégazol. Ces résultats sont présentés dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9 : Abondance relative des métabolites *m/z* par extraction alcaline d'urines. (échantillon du lot à 80 mg/kg). min = minutes ; cps = coups ; Ax/A227 = aire de l'analyte sur l'aire de référence (Mégazol)

<i>Urines 80 mg/kg - butanol - NaOH</i>			
Ion	temps (min)	Aire (cps)	Ax / A227
227 (Mégazol)	18,6	7,15E+09	100%
239	11,1	1,39E+10	194%
243	8,9	1,20E+09	17%
358	13	7,18E+08	10%
213	14,5	5,47E+08	8%
316	10,5	5,22E+08	7%
243	12,2	2,57E+08	4%
343	15,9	2,70E+08	4%
243	15,1	1,24E+08	2%
343	18,2	7,60E+07	1%

Tableau 10 : Abondance relative des métabolites *m/z* par extraction acide d'urines. (échantillon du lot à 80 mg/kg). min=minutes ; cps= coups ; Ax/A227 = aire de l'analyte sur l'aire de référence (Mégazol)

<i>Urines 80 mg/kg - butanol - HCl</i>			
Ion	temps (min)	Aire (cps)	Ax / A227
227 (Mégazol)	18,6	2,77E+08	100%
419	12,2	4,33E+08	156%
243	8,9	4,26E+08	154%
403	12,2	3,72E+08	134%
419	14,7	1,88E+08	68%
239	11,1	1,35E+08	49%
403	6,6	9,87E+07	36%

Nous pouvons observer les ions les plus abondants lors de la métabolisation du Mégazol avec une abondance de l'ion 239 de près du double de celle du Mégazol, et des ions 243 (hydroxy Mégazol, élué à 8,9 min), 419 (hydroxy-Mégazol glucuroné sur l'amine) et 403 (élué à 12,2min) de près de 1,5 fois la valeur du Mégazol en présence.

5.2.2. Méthode MRM

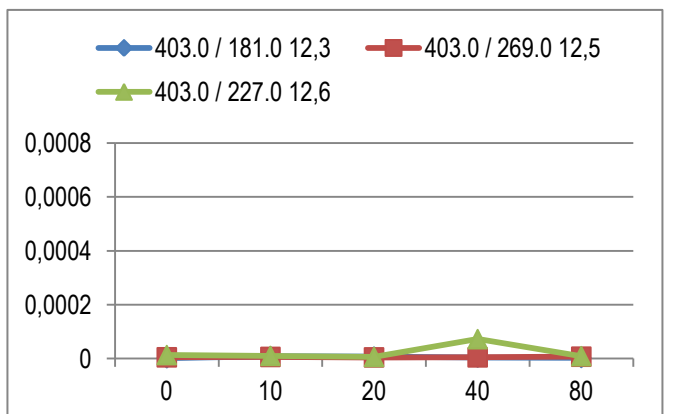
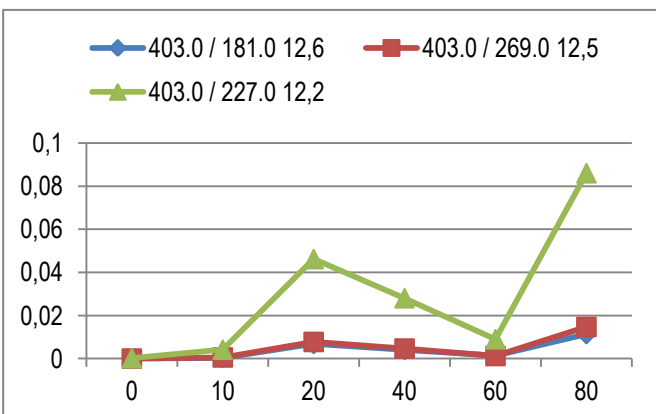
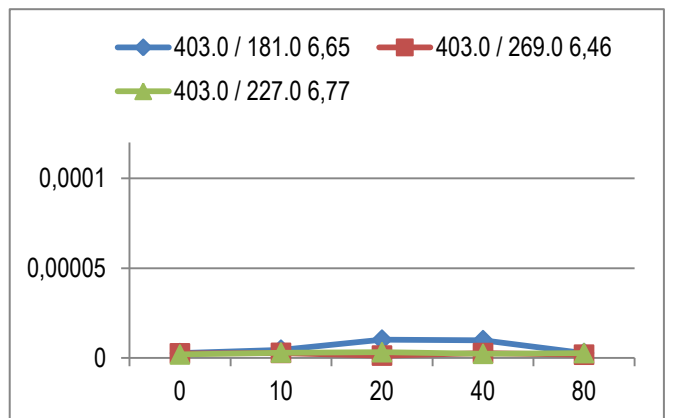
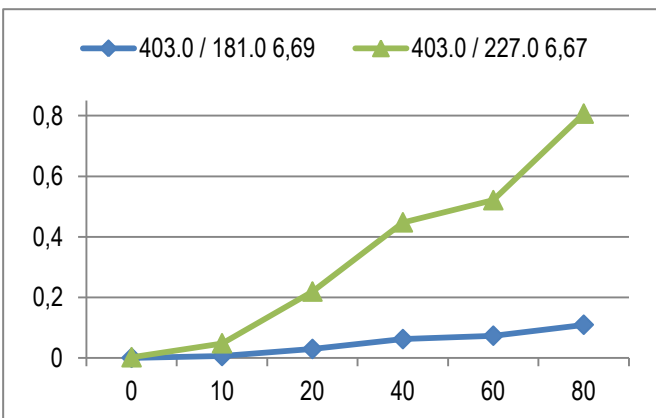
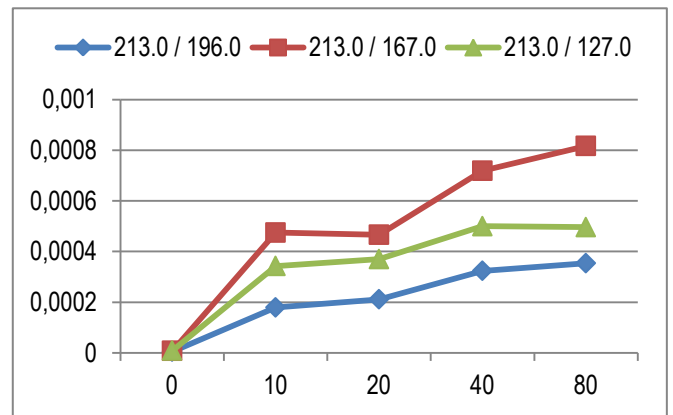
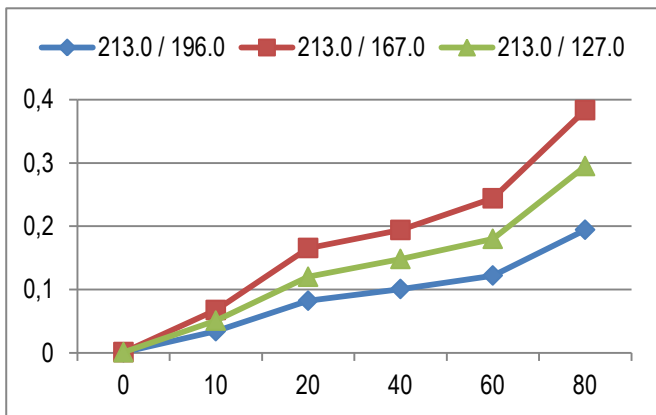
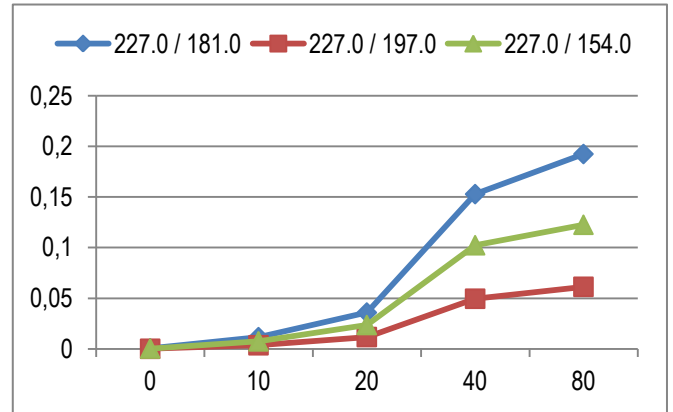
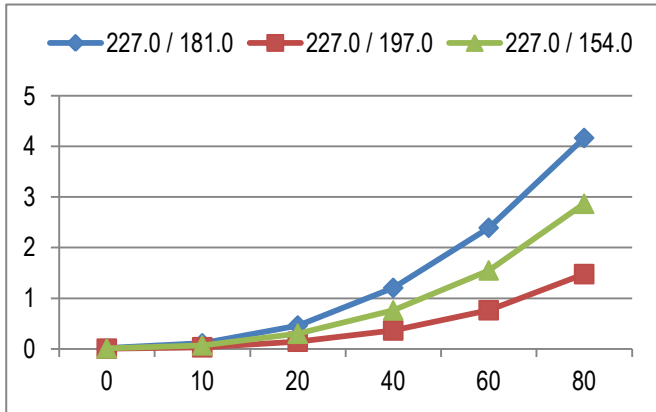
Figure 46 (3 pages suivantes 61-62 et 63) : Comparaison du rapport entre l'aire sous le pic de l'analyte sur le Standard Interne (SI) en fonction des doses utilisées (mg/kg), entre l'urine (récoltée de 3h à 15h après la première dose de Mégazol) et le plasma (récolté 3h après la première dose) des souris traitées.

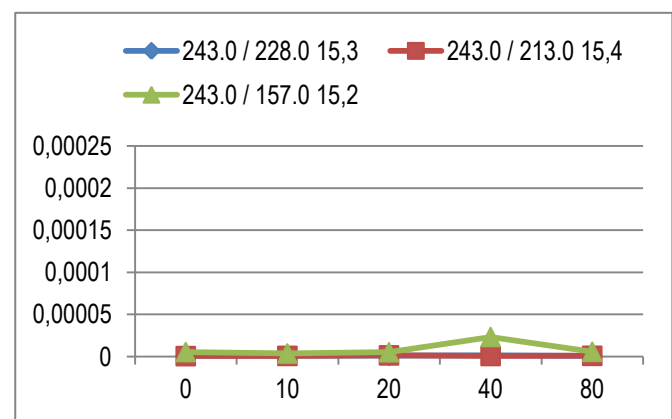
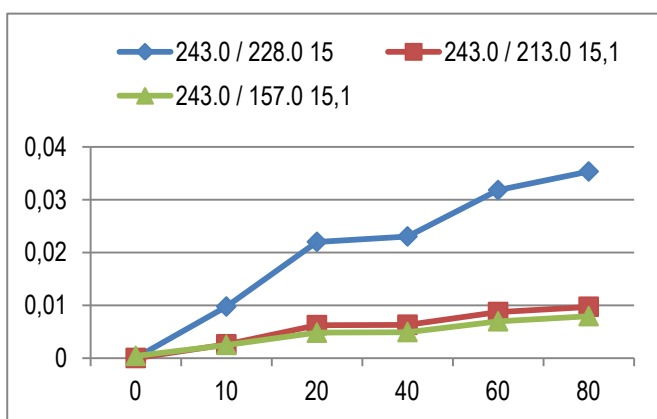
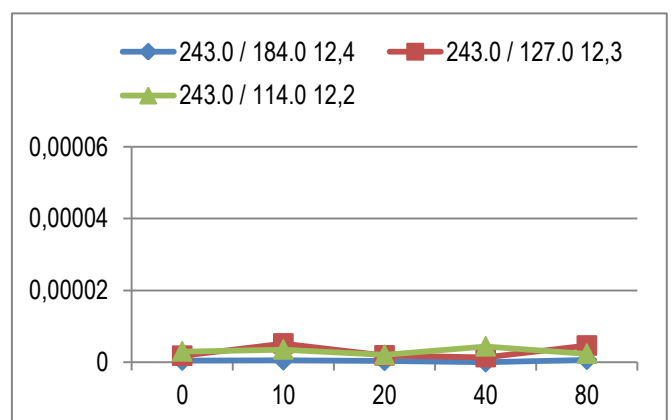
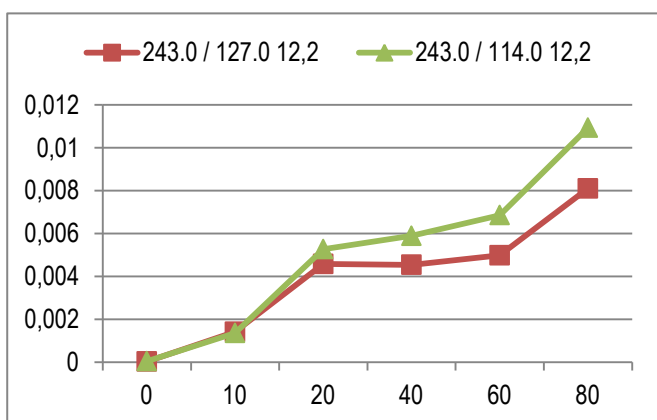
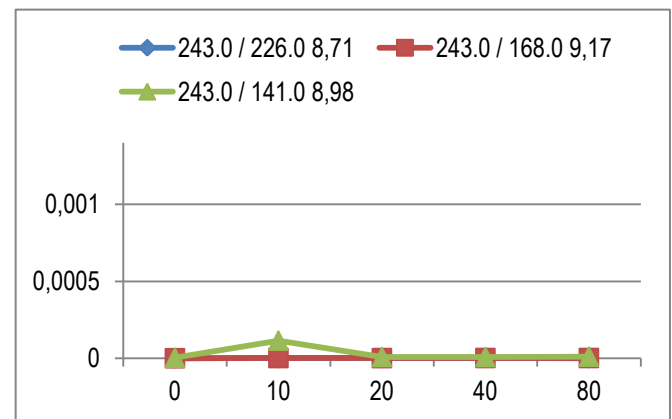
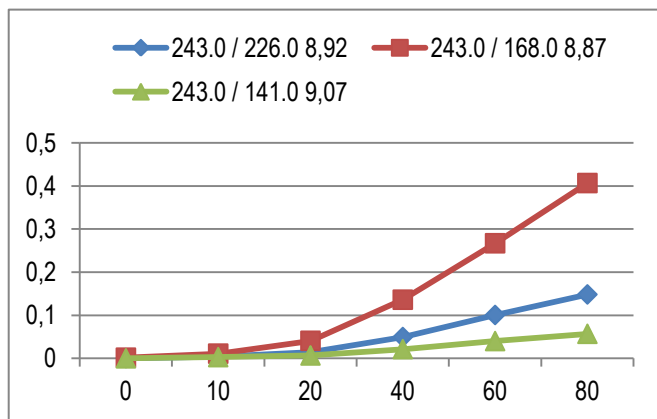
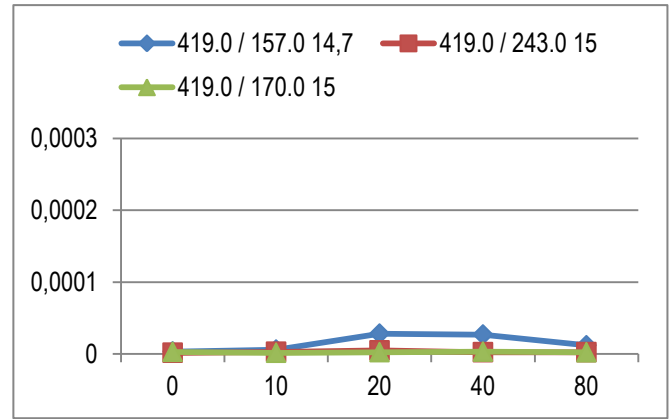
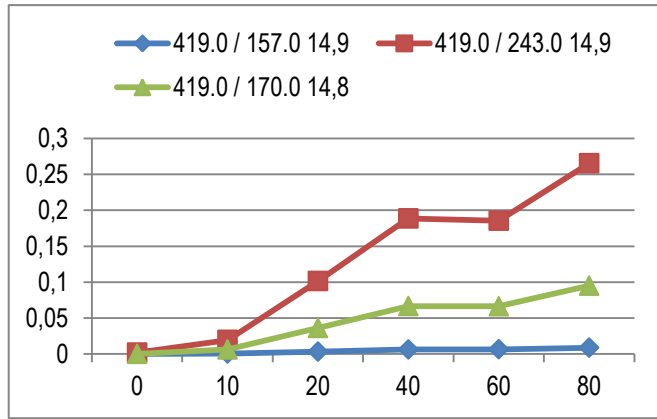
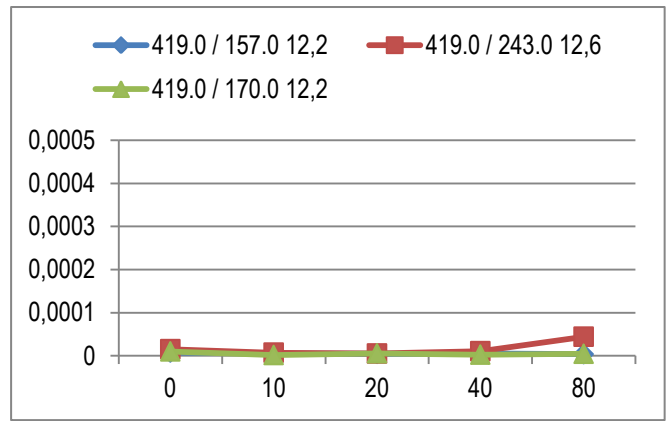
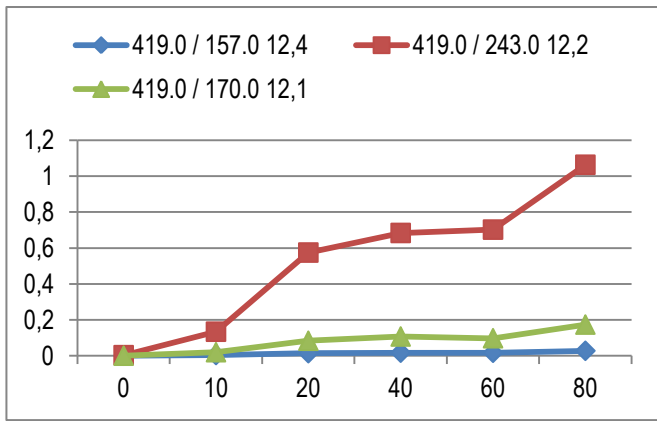
Pour les ions qui ressortent plusieurs fois, le temps d'élution (minutes) est précisé après chaque transition.

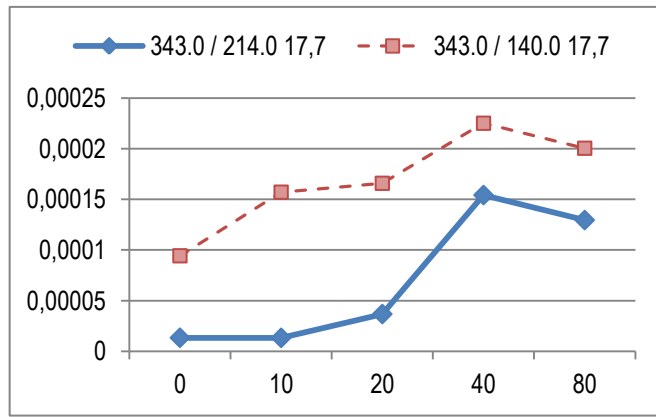
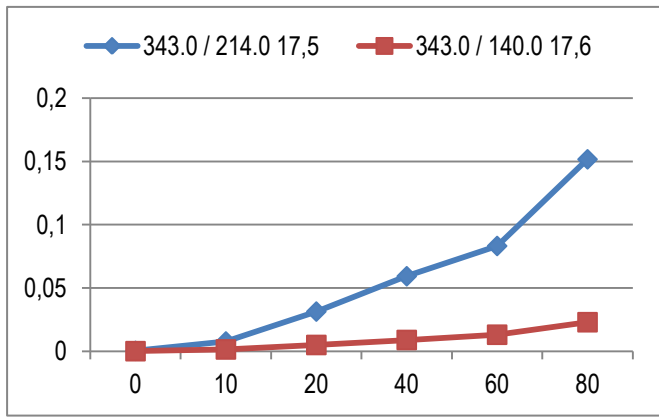
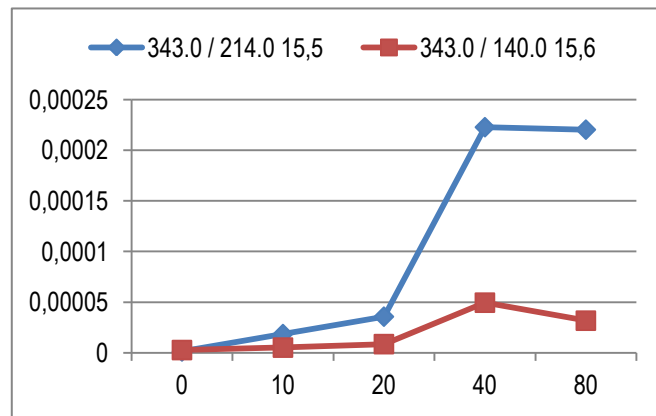
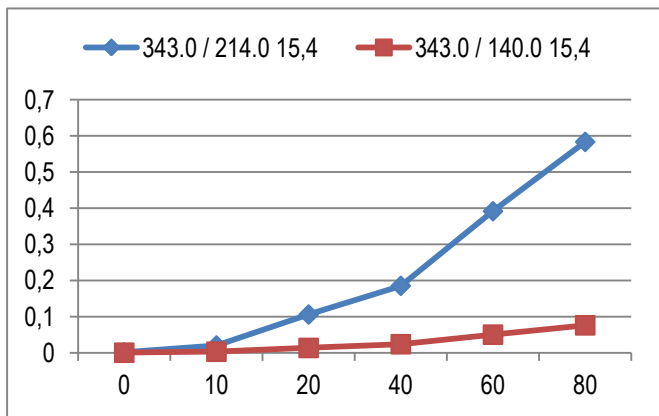
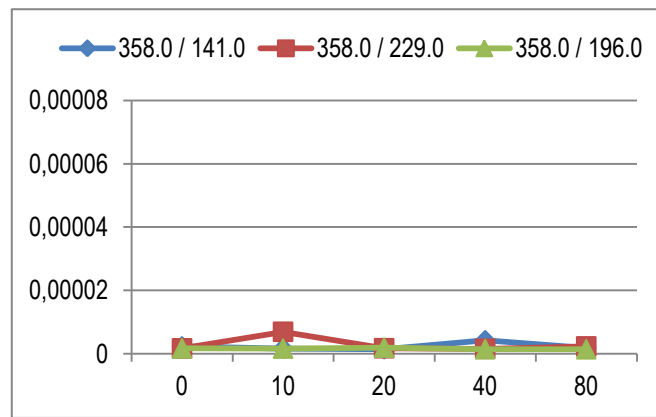
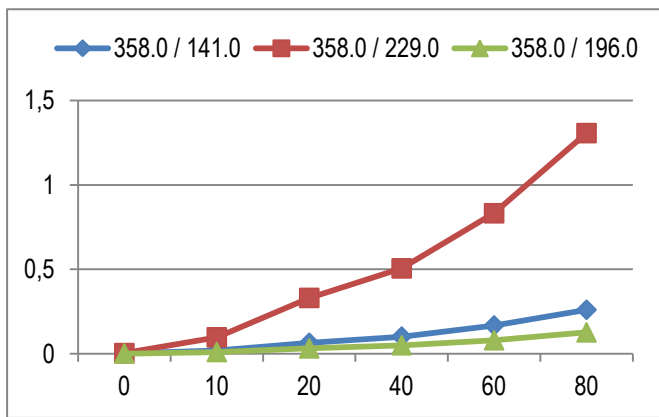
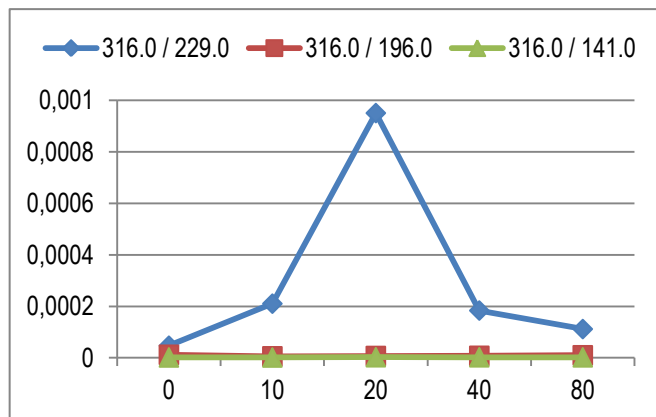
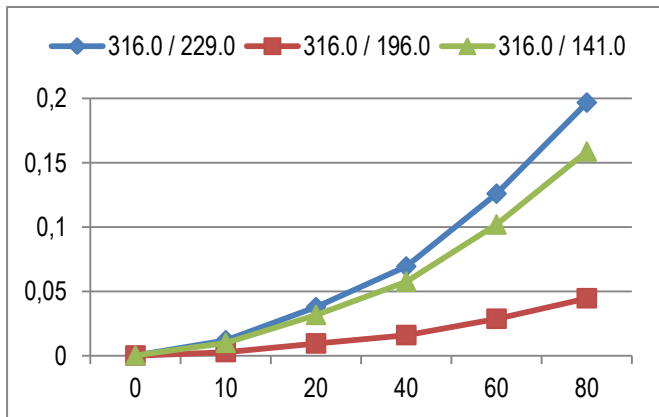
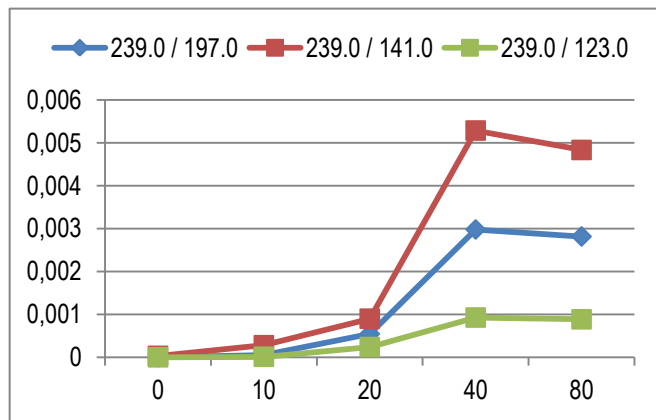
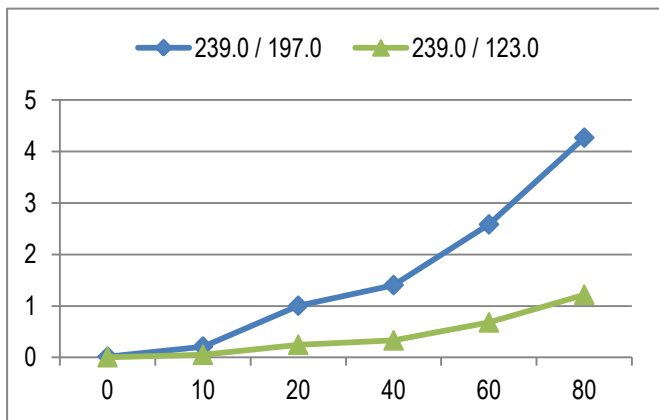
Figure 46: Comparaison du rapport analyte/SI, entre urine et plasma selon les doses

Urine

Plasma







D'après les résultats obtenus par méthode GUS et MRM, notamment ceux illustrés dans la figure 46, nous pouvons voir d'après les courbes issues des échantillons d'urines, une proportionnalité entre la quantité relative des différents métabolites détectés et les concentrations de Mégazol administrées aux souris. Nous pouvons ainsi observer des courbes croissantes avec l'augmentation des doses administrées, ce qui est caractéristique de métabolites d'une molécule.

La comparaison entre les métabolites détectés dans les urines et dans le plasma nous assure la présence dans ce dernier des ions 227 correspondant au Mégazol, mais également de l'ion 213 correspondant au Mégazol déméthylé, de l'ion 239 et de l'ion 343 (15,0 min). L'analyse des échantillons plasmatiques prélevés après la dernière dose de Mégazol a bénéficié d'une extraction optimisée (150 µL d'échantillon, étalon interne dilué au 1/5), ce qui a permis de détecter en plus des 4 ions précédents, les ions 343 (18,2 min) ; 403 (6,6 min) et 419 (12,2 min).

Nous ne pouvons pas dire à ce stade que les autres métabolites sont absents des échantillons issus du plasma. En effet, la méthode ayant été optimisée pour la recherche de métabolites dans les urines, milieu où ils sont très concentrés, nous ne pouvons pas exclure que la limite de détection ait été atteinte avec les échantillons plasmatiques, plus pauvres en métabolites.

5.2.3. Incubation de microsomes hépatiques humaine

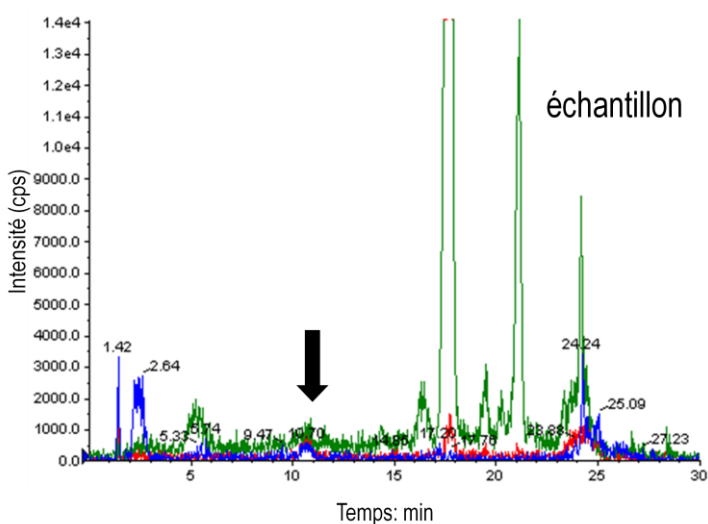
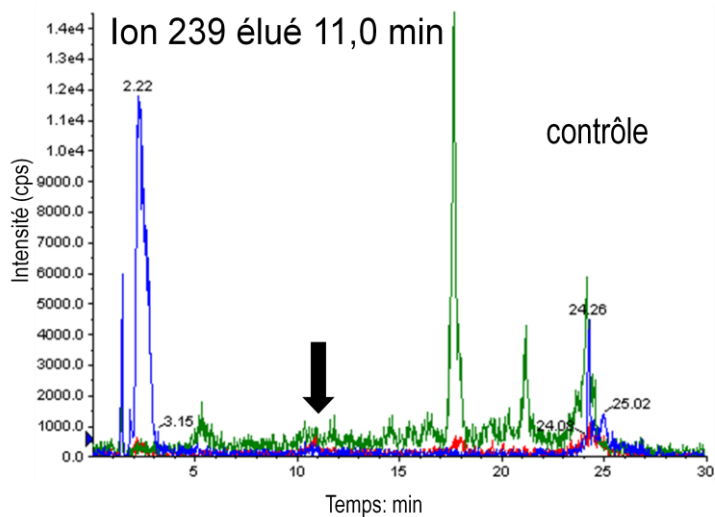
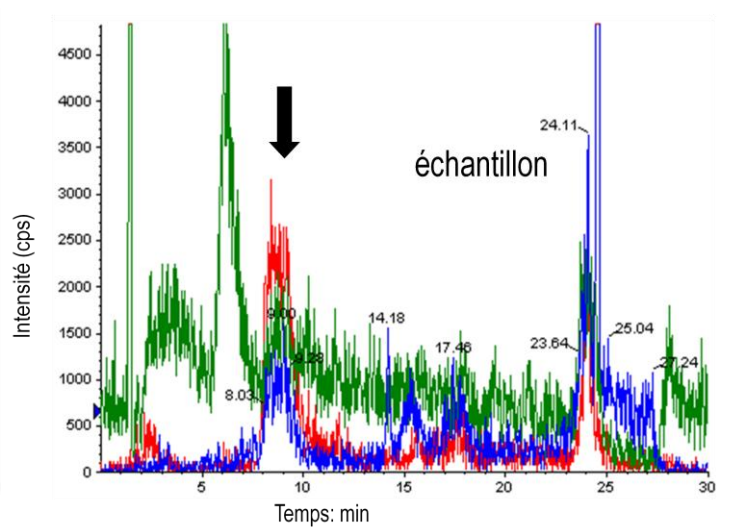
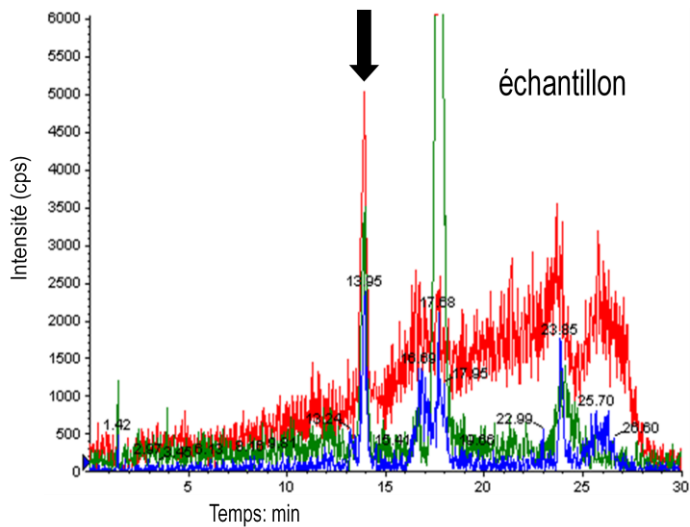
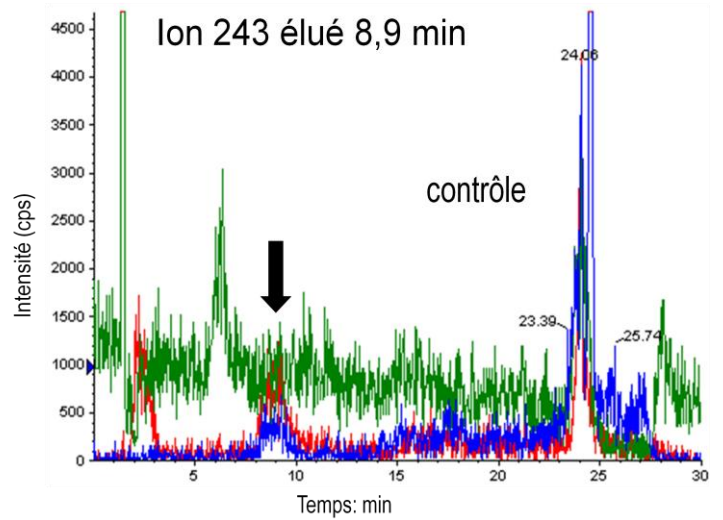
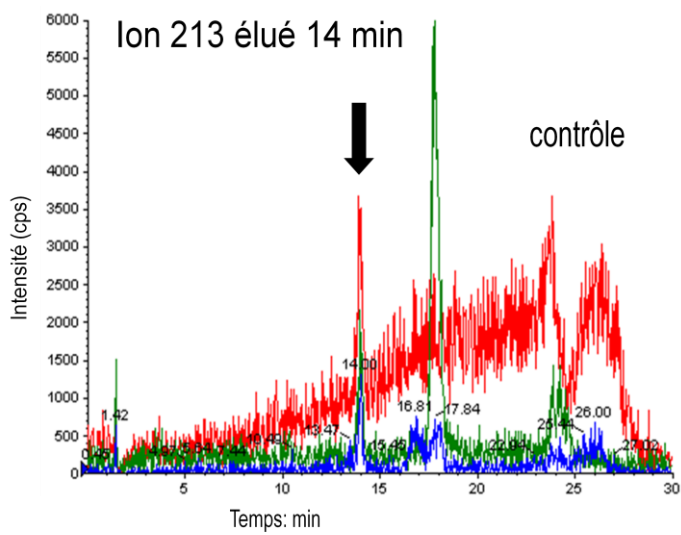
Lors des premiers tests effectués, les résultats obtenus ont montré une très faible métabolisation du Mégazol par les microsomes hépatiques humains, et aucun autre métabolite sauf le Mégazol lui-même.

Après avoir optimisé la méthode HPLC/MS de détection de métabolites dans les urines, nous avons de nouveau analysé nos échantillons de l'incubation par microsomes hépatiques pour obtenir de nouveaux résultats.

Page suivante :

Figure 47 : Spectres HPLC/MS des 2 ions retrouvés dans l'incubation par microsomes hépatiques humains.

Ces spectres illustrent la présence en quantité minime des ions 213 et 243 par de légers pics, l'exemple de l'ion 239 a été mis pour illustrer une molécule absente, avec aucun pic qui ne ressort. min = minutes ; cps = coups



En effet, la quantité de Mégazol (non métabolisé) sur l'échantillon contrôle (sans microsome et donc sans métabolisation) était inférieure à celle de l'échantillon avec métabolisation où le Mégazol aurait dû être transformé pour donner des métabolites. Cette première observation annule toute interprétation de ces résultats. Cependant certains ions ressortent légèrement du bruit de fond : tel que l'ion 227 (Mégazol), l'ion 213 correspondant au Mégazol déméthylé et l'ion 243 sortant à 15,1 min (correspondant à l'une des trois hypothèses émises pour cette masse : Hydroxy-Mégazol, Sulfoxy-Mégazol ou une molécule inconnue).

L'absence des métabolites secondaires tels que les dérivés glucuroconjugés (403 ; 419) qui

sont relativement abondants dans les urines (1,5 x le Mégazol) est tout à fait normale étant donné qu'il n'y a pas d'acide glucuronique mis à disposition pour une conjugaison, dans l'incubation par microsomes hépatiques.

Là encore on ne peut pas conclure en l'absence d'autres métabolites étant donné le défaut de détection dû à l'optimisation prévue pour l'urine.

La figure 48, page suivante, résume les hypothèses structurales formulées pour chacun des ions découverts lors de cette étude.

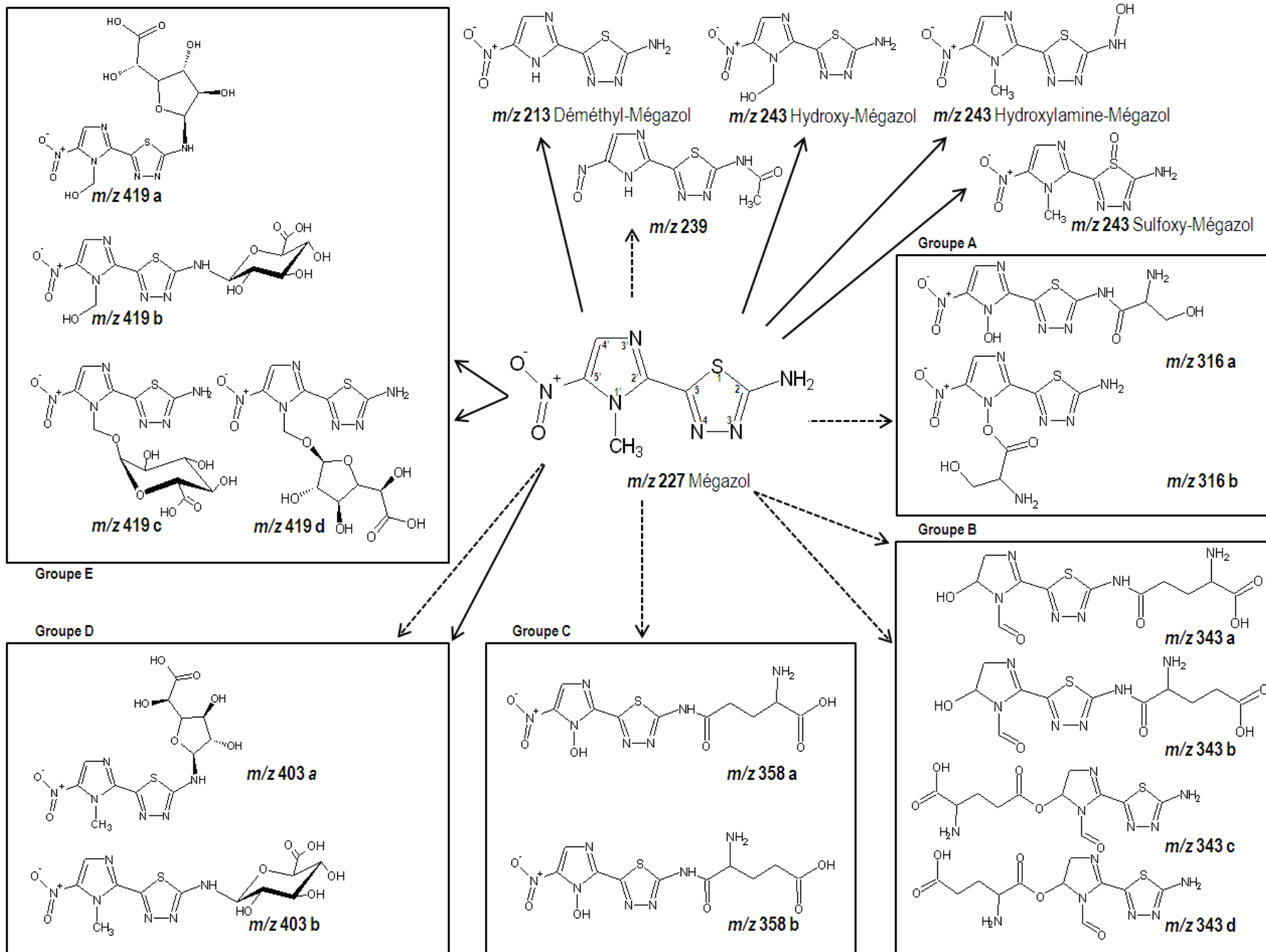


Figure 48 : Résumé des hypothèses de métabolites du Mégazol. Une flèche correspond un pic HPLC/MS, flèche pleine= hypothèse probable, car de métabolisation courante ; flèche pointillée = hypothèses correspondant à des métabolisations complexes

m/z 227 : Mégazol

m/z 213 : Déméthyl-Mégazol

m/z 239 : 1'-N-Déméthyl-5'-N-déoxy-2-N-acetylmégazol

m/z 243 : Hydroxymégazol

m/z 243 : Hydroxylamine Mégazol ou 2-N-Hydroxymégazol

m/z 243 : Sulfoxy Mégazol ou S-Oxymégazol

Groupe A

m/z 316 a: 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxy-2-N-sérinemégazol

m/z 316 b: 1'-N-Déméthyl-1'-N-sérinyloxymégazol

Groupe B

m/z 343 a: 1'-N-Déméthyl-1'-N-formyl-4,5-N-dihydro-5-dénitro-5-hydroxy-2-N-(5-glutamyl)mégazol

m/z 343 b: 1'-N-Déméthyl-1'-N-formyl-4,5-N-dihydro-5-dénitro-5-hydroxy-2-N-(1-glutamyl)mégazol

m/z 343 c: 1'-N-Déméthyl-1'-N-formyl-4,5-N-dihydro-5-dénitro-5-(5-glutamyl)oxymégazol

m/z 343 d: 1'-N-Déméthyl-1'-N-formyl-4,5-N-dihydro-5-dénitro-5-(1-glutamyl)oxymégazol

Groupe C

m/z 358 a: 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxy-2-N-(5-glutamyl)mégazol

m/z 358 b: 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxy-2-N-(1-glutamyl)mégazol

Groupe D

m/z 403 a: 2-N-Glucuronofuranosylmégazol

m/z 403 b: 2-N-Glucuronopyranosylmégazol

Groupe E:

m/z 419 a: 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxyméthyl-2-N-glucuronofuranosylmégazol

m/z 419 b: 1'-N-Déméthyl-1'-N-hydroxyméthyl-2-N-glucuronopyranosylmégazol

m/z 419 c: 1'-N-Glucuronopyranosyloxymégazol

m/z 419 d: 1'-N-Glucuronofuranosyloxymégazol

6. Discussion

6.1. Expérimentation animale

L'objectif de ces expérimentations était d'utiliser une molécule dont le potentiel thérapeutique antiparasitaire a déjà démontré son efficacité sur divers modèles expérimentaux, souris, rats, moutons, singes (Boda *et al*, 2005), mais à des doses efficaces, relativement hautes. Ces doses fonctionnant très bien, personne à notre connaissance, n'a cherché à déterminer si des concentrations plus faibles pouvaient avoir la même efficacité. Puis, la mutagénicité de la molécule fut remise à l'ordre du jour et les recherches sur le Mégazol furent, petit à petit, réduites à néant. C'est en repensant à ce conflit, mutagénicité/dose, que nous avons décidé de rechercher cette dose minimale efficace qui pourrait s'avérer moins mutagène.

Tout au long de cette expérimentation, nous nous sommes heurtés à moult écueils qu'il a fallu pallier, notamment le problème de parasitémie des souris, et les pertes dues aux évasions et aux manipulations. Les souris n'étant pas identifiées ou numérotées, la question se posait de savoir si les souris perdues étaient parasitées ou non.

Il a donc fallu tenir compte de ce nouveau biais lors de l'analyse des résultats. Ainsi, nous avons calculé dans chaque groupe le nombre de souris exploitables comme étant le nombre de souris réellement parasitées, auquel nous avons soustrait les pertes expérimentales et les échappées (en imaginant l'événement le plus négatif : « la souris perdue était parasitée »). Avec ce nouvel effectif diminué nous pouvions alors, obtenir des résultats significatifs, et ce, au détriment de la puissance des tests statistiques qui nous avait fait choisir des lots de souris relativement importants (11 souris par lot).

Une autre surprise, est venue du choix de la souche utilisée. L'idée de départ étant basée sur les articles publiés précédemment par des membres de l'équipe de Limoges qui avaient déjà travaillé sur le Mégazol et son action sur la souche *T. b. brucei* AnTat1.1E. Nous avons donc privilégié cette souche qui malheureusement n'était plus disponible dans notre laboratoire. Nous l'avons donc commandée de nouveau avant de la faire proliférer et de l'injecter aux souris de l'étude.

Nous avons alors, remarqué une différence dans le temps moyen de survie des souris témoins infectées et non traitées. En effet, là où les publications de référence utilisées nous indiquaient un décès à 21 ± 6 jours (Enanga *et al*, 1998) nous avons eu, en moyenne, des décès à 66 jours post infection, ce qui nous a rappelé le caractère pléiomorphe de la souche. De plus, ces décès, en

moyenne trop tardifs, auraient pu nous faire douter du caractère neurologique de l'infection. Car, si le trypanosome met plus de temps à tuer la souris et que nous traitons malgré tout les souris à partir de 21 jours post infection c'est-à-dire au moment du passage de la BHE par les parasites (Jennings *et al*, 1983 ; Bouteille *et al*, 1995 ; Keita *et al*, 1997 ; Enanga *et al*, 1998), ce passage peut alors être mis en doute et avec lui le stade neurologique de la trypanosomose.

Heureusement, pour cet aspect des choses, la suite de l'étude a montré des rechutes chez les souris traitées, que ce soit aux dosages les plus faibles (10 mg/kg), ou plus forts (80 mg/kg). Ces rechutes prouvent donc qu'il y avait des parasites vivants dans le SNC des souris avant le premier jour de traitement.

Concernant les rechutes, une différence notable apparaît entre la plus rapide, 6 jours après la dernière dose (10 mg/kg) et la plus tardive, 119 jours après (40 mg/kg). Il est possible de penser que le dosage à 10 mg/kg était trop faible et qu'il restait après traitement des parasites dans le système lymphatico-sanguin qui auraient été visibles à la parasitémie suivante. Mais il ne faut pas oublier le rôle de la Suramine qui a été utilisée pour déparasiter le sang périphérique avant que le Mégazol n'intervienne. D'après Nau *et al*, (1998) la concentration plasmatique d'un traitement utilisé doit être d'au moins 10 fois la concentration minimum inhibitrice pour permettre à la fois un passage de la BHE et une activité thérapeutique correcte à l'intérieur du SNC. Dans le cas présent, la concentration de 10 mg/kg doit donc être insuffisante pour permettre un passage de la BHE et une activité thérapeutique correcte.

Une question se pose, pour la rechute la plus tardive à 119 jours après traitement (40 mg/kg). En effet, les autres premières rechutes apparaissent bien plus tôt : 6 jours après le traitement (10 mg/kg) ; 22 jours post traitement (80 mg/kg) et 26 jours post traitement (20 mg/kg). Il se pourrait que cette rechute tardive soit due au phénomène de séquestration du parasite déjà observé chez *T. brucei*, *T. cruzi* et *T. vivax* (Baker *et al*, 1989 ; Portella *et al*, 2009). Le parasite peut trouver des sites comme les muscles ou le cœur (Portella *et al*, 2009), que l'antiparasitaire ne peut atteindre durant le traitement. Après un délai indéterminé, le parasite refait surface et se multiplie. Il est également possible que la souche de parasite ayant permis la rechute soit résistante à l'antiparasitaire après une mutation génétique. Whitelaw a éliminé cette hypothèse chez des *T. vivax* traités au Diminazene en testant la sensibilité des parasites issus de la rechute (Whitelaw *et al*, 1988). Si cette hypothèse de séquestration est vraie, cela veut dire que le stade nerveux de la souris a été correctement traité à 40 mg/kg, et que la rechute était due à un ou des parasites séquestrés et qui n'ont pu entrer en contact avec l'antiparasitaire.

Les résultats statistiques nous montrent tous une survie significativement plus élevée chez les groupes ayant reçu du Mégazol par rapport au groupe témoin infecté mais non traité. L'activité du Mégazol est donc bien confirmée, mais quelle en est la dose efficace la plus faible ?

Si les groupes sont méthodiquement tous comparés entre eux (en plus de la comparaison logique au lot témoin), il est alors possible de voir une survie significativement plus élevée chez les groupes ayant eu les moins de décès (60, 40, 20 mg/kg) non pas uniquement face au groupe témoin, mais également face au groupe traité par 10 mg/kg. Cette observation permet d'exclure ce dosage comme permettant une activité thérapeutique efficace.

Un résultat décevant est la rechute de 2 souris dans le lot traité à 80 mg/kg. En effet cette concentration devait nous servir de contrôle de survie. Mais s'agissant d'expériences biologiques, nous ne pouvons jamais exclure les résultats les plus inattendus. De plus une rechute (sur 15 souris) a déjà été décrite avec ce même protocole (Enanga *et al*, 1998). Cependant, ces deux rechutes dans le groupe traité au dosage maximum nous ont permis d'affirmer l'efficacité de l'infection des souris qui pouvait être remis en cause face à la pléiomorphie de la souche utilisée. Il est difficile d'interpréter ces deux décès, au vu du groupe traité à 60 mg/kg qui lui n'en a eu aucun. Une erreur de manipulation peut expliquer cela, notamment l'étape du gavage des souris qui peut être délicat et parfois accompagné de régurgitation du traitement.

Le protocole utilisé nous a permis de considérer toute rechute survenue après traitement, comme étant due à une phase nerveuse de la maladie (rechute due aux parasites présents dans le SNC). En effet, l'usage d'une dose primaire de Suramine (20mg/kg) en plus d'améliorer l'activité du Mégazol secondaire, a, en théorie, permis un lavage complet de tous les parasites présents dans le système lymphatico sanguin de l'animal. Ainsi, le Mégazol n'avait plus qu'à se concentrer sur les parasites du SNC. Il aurait pu cependant être fait des analyses de cerveau *post mortem* pour confirmer la véracité de l'hypothèse d'une mort par phase nerveuse de la maladie.

Au vu des résultats, et des difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre de l'étude, il est difficile de déterminer précisément laquelle de ces doses est la plus efficace. Des groupes, qui au départ avaient été volontairement choisis pour comporter un maximum de sujet (11 souris par groupe) et une significativité statistique optimale, ont été réduits au fur et à mesure de l'observation à cause des problèmes, de perte, et de souris non infectées, réduisant la puissance des groupes. D'instinct, nous pourrions choisir 60 mg/kg étant donné que le groupe correspondant n'a subi aucune perte. Cependant il est intéressant d'observer que les groupes aux dosages de 20 et de 40 mg/kg n'ont subi qu'un unique décès durant toute la durée d'observation. De plus, si l'hypothèse du phénomène de séquestration est

vrai et que la rechute n'est pas due à un défaut de traitement du SNC de la souris, on ne peut alors pas exclure des doses efficaces celle de 40 mg/kg.

Ainsi il n'a pas été possible de choisir une dose statistiquement plus active parmi les doses testées. Sans doute est-ce une dose située entre 20 et 60 mg/kg, mais reste à savoir si elle se situe plutôt en dessous, plutôt au dessus ou à 40 mg/kg ?

Il faudrait réitérer l'expérience en se concentrant sur cette fourchette de concentration, en utilisant d'autres doses intermédiaires pour mieux cibler la bonne dose, des groupes plus nombreux pour améliorer le pouvoir statistique, une méthode de parasitage plus sûre, une souche non pléiomorphe, et une analyse *post mortem* des cerveaux de souris pour confirmer la cause du décès.

Ces résultats ont malgré tout, démontré qu'il était possible d'obtenir un taux de 100 % de survie par un traitement au Mégazol de dose inférieure (60 mg/kg) à celles utilisées par le passé (80 et 100 mg/kg). Mais, est-ce que, utiliser une dose inférieure permet de diminuer la mutagénicité d'une molécule ?

Depuis le début des années 1980 et la création du test d'Ames, les mutagénicités de toute sorte de molécules, dont le Mégazol ont été testées et avérées (Ferreira *et al*, 1986 ; Ferreira *et al*, 1988 (2)). D'autres molécules mutagènes ont été mises sur le marché, comme le Métronidazole dont la génotoxicité est connue depuis sa création (Rosenkranz *et al*, 1975, Lindmark *et al*, 1976) et confirmée encore récemment (Sekis *et al*, 2009 ; Bendesky *et al*, 2002). Cette molécule reste cependant des plus efficaces et continue actuellement de rendre service à la santé publique. Cela n'empêche pas la recherche de trouver des dérivés parfois plus actifs et même moins génotoxiques qui seront peut être l'avenir de cette molécule (Crozet *et al*, 2009).

Le Féxinidazole, un autre 5-nitro-imidazolé proche du Mégazol, vient d'être accepté en phase clinique de son développement. Pourtant lui et ses deux métabolites actifs (dérivés sulfoxyde et sulfone) sont mutagènes au test de Salmonelles d'Ames, avec une mutagénicité atténuée voir perdue sur les souches de salmonelles dénuées ou manquant de nitro-réductases (Tweats *et al*, 2012). En consultant le présent document au paragraphe « mutagénicité » du Mégazol, il est possible de voir que les mêmes observations ont été décrites et publiées par Ferreira *et al*, en 1986 puis par De Morais *et al*, en 1998 sans pour autant que la Mégazol ai été accepté en phase clinique.

En effet, les recherches concernant la molécule ont été stoppées en Europe depuis la publication de l'article de Nessler *et al*, 2004 sur sa mutagénicité. Cette étude est d'ailleurs basée sur des lignes de conduite à tenir publiées en 1997 par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques) « OECD guidelines 473 » et « OECD guidelines 474 » ainsi que la directive 2000/32/EC-

B12 qui est une traduction de la précédente. Or ces lignes de conduite imposent de tester la molécule sur trois niveaux de doses allant d'une toxicité nulle ou faible à une toxicité maximale. Cette dernière dose étant définie comme la concentration entraînant des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes seraient létales. Et si les doses s'administrent sur plusieurs jours, il y a une limite fixée par l'OCDE à 2 000 mg/kg/jour jusqu'à 14 jours de traitement et 1 000 mg/kg/jour pour plus de 14 jours. Donc si une molécule est très peu létale à forte dose, sa mutagénicité doit également être testée à forte dose... Or le pouvoir toxique d'une molécule (d'entraîner la mort) n'a rien à voir avec son pouvoir mutagène. Une molécule qui a la chance de pouvoir être administrée à haute dose sans devenir toxique a une marge thérapeutique élevée, ce qui est un avantage en thérapie, si en plus elle a la chance de pouvoir être active à des doses très faibles, il est étrange de devoir tester sa mutagénicité à des doses extrêmes.

L'équipe de Nessler *et al*, a trouvé, chez le rat, une DMT (Dose Maximale Tolérée) supérieure à 2 000 mg/kg x 2 administrée par voie orale à 24h d'intervalle. Ils ont donc dû tester la mutagénicité de la molécule à 2 000 mg/kg x 2 sur 2 jours.

Il suffit de s'apercevoir que la dose de 2 000 mg/kg représente 33 fois la dose ayant permis l'obtention d'un taux de survie de 100% dans cette étude (60 mg/kg). La logique voudrait qu'un test de mutagénicité d'une molécule soit effectué en fonction de la dose à laquelle celle-ci est utilisée pour une indication thérapeutique précise et en tenant compte de sa forme pharmaceutique et de sa voie d'administration et non à la dose maximale qui permet de ne pas tuer un organisme.

Par exemple, des tests à la dose utilisée lors d'une utilisation normale pour savoir si celle-ci entraîne des mutagénicités notoires seraient plus adaptés et permettraient de savoir si l'utilisation de la molécule dans son indication d'antiparasitaire est mutagène. Puis un autre test, mimant une intoxication concrète avec une dose qu'il serait possible d'obtenir chez un malade qui désire s'intoxiquer. Ici, il s'agirait d'un traitement de Mégazol sur 4 jours (maximum), le malade aurait donc accès à une boîte avec 4 comprimés sous blister lui permettant d'en avaler au maximum seulement 4 en une prise. Avec une dose de 60 mg/kg cela ferait 240 mg/kg (voir de 20 à 60 après une étude approfondie), et pourquoi ne pas multiplier par le nombre de boîtes qu'il est possible de se procurer pour une famille si vraiment la personne désire s'intoxiquer ou en intoxiquer une autre.

Le fait d'imposer une dose qui n'aura jamais l'occasion d'être utilisée, et de faire ainsi cesser toute recherche pour une molécule au potentiel important est un déni complet de la base de la thérapeutique : savoir peser le bénéfice et le risque d'un traitement.

6.2. Recherche de métabolites

La méthode GUS nous a permis d'isoler 14 ions d'intérêt dont la découverte de la structure moléculaire est une énigme pour chacun d'entre eux. Les indices principaux nous permettant de découvrir ces structures sont les temps de rétention, les rapports m/z , la structure de la molécule mère, et les métabolisations types survenant dans l'organisme (phase 1 et phase 2).

La méthode MRM nous a permis de doser plus précisément ces mêmes métabolites dans nos échantillons d'urine, de plasma et d'incubation par microsomes hépatiques.

En observant les 3 pages de la figure 46, Nous pouvons remarquer sur la comparaison Urine/Plasma de l'ion 316, une différence notable entre les deux profils d'élution. En effet, dans l'urine les courbes des transitions 316/229 (bleu) et 316/141 (verte) sont quasiment côte à côte et la troisième transition 316/196 (rouge), bien que plus basse, suit la même courbure que ses analogues bleus et verts. A l'inverse, dans le plasma nous avons les transitions 316/141 (verte) et 316/196 (rouge) qui restent collées à l'axe des abscisses alors que la transition 316/229 (bleu) augmente puis diminue brusquement. Une telle différence de profil entre deux échantillons est étrange et pose la question de l'interprétation de ce résultat obtenu dans le plasma. La réalité de ce résultat peut être mise en doute. Il pourrait s'agir d'un artefact.

De même pour l'ion 343, élué vers 17,5 minutes ; le graphique montre dans l'échantillon urinaire une courbe de la transition 343/214 (bleue) avec des valeurs supérieures à la transition 343/140 (rouge). Ce schéma est inversé (rouge sur bleu au lieu de bleu sur rouge) dans l'échantillon plasmatique et en annule également son interprétabilité.

Il faut également se rappeler de la cinétique de prélèvement des échantillons ; les urines, sur 12h à partir de 3h après l'administration du Mégazol et le plasma, à 3h précise après l'administration. Le premier échantillon est donc cumulatif alors que le second illustre un moment précis.

Ce choix de 3h pour le prélèvement a été fait car il correspond à la demi vie d'élimination du Mégazol administré avec la Suramine (contre 42 minutes seul) (Enanga *et al*, 1999), ainsi aux moments des prélèvements, la métabolisation du Mégazol devait déjà être entamée (avec présence supposée de métabolites dans le plasma) et l'élimination urinaire des métabolites devait commencer aux alentours de ces 3h. Mais rien n'exclut qu'à ce moment là, certains des métabolites n'ont pas déjà été filtrés du plasma vers les urines. Il est d'ailleurs fort probable que cela soit le cas pour les glucuroconjugués (hydroxy Mégazol (419x2) et Mégazol (403x2)) dont la filtration rénale est rapide une fois que l'hydrophilie de la molécule est augmentée par la glucurono-conjugaison.

L'inverse est également possible, avec l'éventualité que certains des métabolites n'aient pas encore été synthétisés au moment du prélèvement plasmatique.

En se référant à l'abondance relative de l'ion 239 (194% du Mégazol en présence) déterminée précédemment dans les urines de souris (tableaux 9 et 10), l'absence de l'ion 239 dans l'incubation par microsomes hépatiques paraît étonnante. En effet, si nous comparons les autres ions, 213 et 243 (8,9 min); dans les urines de souris, nous les retrouvons respectivement à 8% et 154 % de Mégazol et nous les retrouvons bien tous les deux dans la incubation de microsomes hépatiques. Or la quantité de l'ion 239 était de près du double de celle du Mégazol dans les urines, et nulle trace de cet ion n'est observable à l'analyse des incubations de microsomes hépatiques.

Une des hypothèses probables est qu'il s'agirait d'un métabolite spécifique des souris, il faut savoir qu'il y a des différences inter-espèces. En effet lors de l'incubation par microsomes hépatiques, les microsomes de foies de rats sont beaucoup plus oxydatifs que ceux des humains. Prenons l'exemple d'une molécule simple ; le Méthanol. Il est métabolisé chez l'homme à 80% par l'alcool déshydrogénase du foie en formaldéhyde puis en acide formique dont une partie est transformée en CO₂ via la voie dépendante du tétrahydrofolate. Chez les rongeurs, cette première étape de transformation du méthanol empreinte majoritairement la voie de la catalase. Cette simple différence d'affinité de voie de métabolisation entre deux espèces entraîne ainsi une différence notable de métabolites synthétisés. Le méthanol est ensuite éliminé dans l'air sous forme inchangée ou de CO₂, et dans les urines sous forme de méthanol (moins de 10%) ou d'acide formique avec des cinétiques propres à chaque espèce pouvant expliquer certaines différences quantitatives selon le type d'échantillon analysé et l'instant auquel il est analysé (INRS, 2010).

L'ion 239 fait partie avec les ions 316, 358 et 343x2 des ions dont la structure n'est qu'hypothétique. Les spectres de fragmentation en annexe (p116-126), montrent cependant des indices. En effet, les ions 343 et 358 ont en commun une perte de -129 pour donner respectivement des ions de *m/z* 214 et 229. Or cet ion 229 apparaît également dans la fragmentation de l'ion 316 après une perte de -87.

La molécule la plus surprenante et qui garde encore son mystère, est l'ion 239. Son rapport *m/z* n'est pas très éloigné de celui du Mégazol. L'ion 239 est donc un hypothétique métabolite de phase 1 (*m/z* beaucoup plus élevé s'il y a conjugaison). Cela le rend d'autant plus attrayant, tant il est vrai que si l'action thérapeutique du Mégazol, vient de l'un de ses métabolites, il est peu probable que ce soit grâce à un métabolite de phase 2, car ces derniers sont théoriquement excrétés plus rapidement. Il est retrouvé à près du double du Mégazol dans les urines, et sa structure reste un mystère. *m/z* 239

correspondant au Mégazol +12, il ne peut pas s'agir d'un gain de carbone pur (12). Cet ion est sans doute issu d'une métabolisation plus complexe, avec perte et gain d'atomes.

Nous avons pu déterminer une formule, uniquement basée sur les variations de masses observées sur son spectre de fragmentation (Annexe 8). Cet ion serait construit sur la base du Mégazol déméthylé. La première perte du spectre est de -42 indiquant la présence sur la molécule d'un groupement acétyle (Aulas *et al*, 2008) qui serait fixé le plus probablement sur le -NH₂ de la molécule mère. Cette molécule de déméthyle-Mégazol acétylé donne une masse de m/z 255 ce qui implique un départ d'oxygène ($255 - 16 = 239$) et donc le remplacement du -NO₂ en -NO. Ce métabolite serait alors un dérivé nitroso du Mégazol déméthylé avec un groupement amine acétylé, illustré dans la figure 42.

Nous manquons hélas, d'éléments pour confirmer cette hypothèse structurale de l'ion 239.

Si cette molécule est maintenant étudiée du point de vue biologique de la métabolisation et de la biotransformation. Les étapes de déméthylation et d'acétylation sont très courantes pour une métabolisation d'un xénobiotique, reste l'hypothèse d'une désoxygénation du groupement nitro, qui est à priori peu commune. La métabolisation a plutôt tendance à mono oxygéner les molécules *via* les cytochromes P450.

Une autre approche de cette molécule est de s'apercevoir qu'il s'agit d'un dérivé nitroso, or ceux-ci sont réputés pour leur mutagénicité importante (IARC-WHO, 1991), il pourrait donc s'agir de la molécule responsable de l'activité mutagénique du Mégazol. Si en plus, elle n'est pas retrouvée dans l'incubation par microsomes hépatiques humains, et qu'elle est réellement spécifique uniquement de la souris, cela pourrait ouvrir des voies de recherches très intéressantes.

Conclusion

Cette étude a permis, non pas de déterminer précisément la dose minimale efficace du Mégazol mais, en éliminant le dosage à 10 mg/kg et en obtenant 100% de survie dans le groupe traité à 60 mg/kg, de la recentrer dans l'intervalle allant de 20 à 60 mg/kg.

Concernant l'étude de la métabolisation du Mégazol, l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse nous a permis de déterminer précisément les masses molaires (M) de ses 13 métabolites détectés dans les urines de souris : ion 213 : M=212 ; 2 ions 403 de M=402 ; 2 ions 419 de M=418 ; 3 ions 243 de M=242 ; ion 239 de M=238 ; ion 316 de M=315 ; ion 358 de M=357 ; 2 ions 343 de M 342.

En ce qui concerne la caractérisation de ces 13 métabolites, des structures ont pu être proposées pour à peu près tous les ions décrits, d'après l'étude de la molécule mère (Mégazol) et des spectres de fragmentation de chacune. Parmi ces propositions seules quelques une peuvent être admises car suivant les métabolisations classiques, de tout exogène dans l'organisme.

Avec par exemple une métabolisation de phase 1 :

- ✓ Déméthylation, avec l'ion 213 (Mégazol déméthylé)
- ✓ Hydroxylation, avec les 2 ions 243 (Mégazol hydroxylé (TR=8,9 min), et le Mégazol hydroxylamine (TR=12,2 min))
- ✓ Oxydation du soufre, avec l'ion 243 (Mégazol sulfoxyde (TR=15,1 min))

Pour les métabolisations de phase 2, la plus classique est la glucurono-conjugaison avec pour le Mégazol :

- ✓ Les 2 ions 403 dont seule l'hypothèse du Mégazol glucuroné sur l'amine semble possible
- ✓ Les 2 ions 419 avec le Mégazol hydroxylé glucuroné sur l'amine (TR=12,2 min) et le Mégazol glucuroné sur l'hydroxyle (TR=14,7min)

Les structures proposées pour les ions 239 ; 316 ; 258 ; et les 2 ions 343 nécessiteraient une métabolisation du Mégazol bien plus inhabituelle et complexe nécessitant plusieurs étapes de biotransformation. Ces structures restent donc des hypothèses de travail, à confirmer expérimentalement par la suite.

Cette étude aura permis de confirmer l'existence d'une dose efficace du Mégazol inférieure à celles utilisées dans les travaux antérieurs. Cette dose reste toutefois, à déterminer avec plus de précision.

La découverte de tous ces métabolites ouvre la porte sur un immense travail, tout d'abord de confirmation des hypothèses émises et par la suite de synthèse de ces molécules et de test de celles-ci sur des trypanosomes *in vitro*, puis *in vivo*.

Bibliographie

AFSSAPS. *Quantification de Protéines Spécifiques par SRM/MRM – Perspectives d'Application et Limitations Actuelles*. Concept Paper, AFSSAPS, Saint-Denis: Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, (2012): 1-16.

Agrawal, S. Anderson, P. Durbeej, M. Van Rooijen, N. Ivars, F. Opdenakker, G. Sorokin, L, M. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine* 203 (2006): 1007-1019.

Ames, B, N. McCann, J. Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation research* 31, n° 6 (1975): 347-364.

Amin, D, N. Rottenberg, M, E. Thomsen, A, R. Mumba, D. Fenger, C. Kristensson, K. Büscher, P. Finsen, B. Masocha, W. Expression and role of CXCL10 during the encephalitic stage of experimental and clinical African trypanosomiasis. *The Journal of Infectious Diseases* 200 (2009): 1556-1565.

Ancelle, T. Paugam, A. Bourlioux, F. Merad, A. Vigier, J, P. Detection of trypanosomes in blood by the Quantitative Buffy Coat (QBC) technique: experimental evaluation. *Médecine Tropicale* 57 (1997): 245-248.

Aulas, A. Ballester, A. Bareille, J. Banisty, H. Dahmani, N. Delverdier, E. Dimitrova, Y. Dromer, K. Jacquet, K. Mangion, M. Munoz, P. Prudhomme, T. Razafimahatratra, S. Rottier, K. Zmir, F. *Utilisation de la spectrométrie de masse pour diverses études protéomiques en 2007-2008* Rapport de Master 2 (2008): 40.

Bacchi, C, J. Garofalo, J. Ciminelli, M. Rattendi, D. Goldberg, B. McCann, P, P. Yarlett, N. Resistance to DL-alpha-difluoromethylornithine by clinical isolates of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Role of S-adenosylmethionine. *Biochemical Pharmacology* 46, n° 3 (1993): 471-481.

Bacchi, C, J. Nathan, H, C. Hutner, S, H. McCann, P, P. Sjoerdsma, A. Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science* 210, n° 4467 (1980) 332-334.

Bacchi, C, J. Nathan, H, C. Yarlett, N. Goldberg, B. McCann, P, P. Sjoerdsma, A. Saric, M. Clarkson, A, B, Jr. Combination chemotherapy of drug-resistant *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections in mice using DL-alpha-difluoromethylornithine and standard trypanocides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, n° 3 (1994): 563-569.

Bachmann, H, J. Shirk, R, J. Layton, H, W. Kemp, G, A. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agents. IV. Activity in mice and chicks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8 (1968): 524-527.

Bailly, C. Donkor, I, O. Gentle, D. Thornalley, M. Waring, M, J. Sequence-selective binding to DNA of cis- and trans- butamidine analogues of the anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia drug pentamidine. *Molecular pharmacology* 46, n° 2 (1994): 313-322.

Baker, J, R. *Advances in Parasitology*. Vol. 28. London: Academic press limited, 1989.

- Barrett, M, P. Fairlamb, A, H. Rousseau, B. Chauvière, G. Perié, J. Uptake of the nitroimidazole drug megalzol by African trypanosomes. *Biochemical Pharmacology*, n° 59 (2000): 615-620.
- Barrett, M, P. Fairlamb, A, H. The biochemical basis of arsenical-diamidine crossresistance in African trypanosomes. *Parasitology today* 15, n° 4 (1999): 136-140.
- Barrett, S, V. Barrett, M, P. Anti-sleeping sickness drugs and cancer chemotherapy. *Parasitology today* 16, n° 1 (2000): 7-9.
- Bass, K, E. Sommer, J, M. Cheng, Q, L. Wang, C, C. Mouse ornithine decarboxylase is stable in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* 267, n° 16 (1992): 11034-11037.
- Bedat-Millet, A, L. Charpentier, S. Monge-Strauss, M, F. Woimant, F. Psychiatric presentation of human African trypanosomiasis: overview of diagnostic pitfalls, interest of difluoromethylornithine treatment and contribution of magnetic resonance imaging. *Revue Neurologique* 156 (2000): 506-509.
- Benaim, G. Lopez-Estraño, C. Docampo, R. Moreno, S, N. A calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump in plasma-membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*; selective inhibition by pentamidine. *Biochemical journal* 296, n° 3 (1993): 759-763.
- Bendesky, A. Menéndez, D. Ostrosky-Wegman, P. Is metronidazole carcinogenic? *Mutation research* 511, n° 2 (2002): 133-144.
- Berger BJ, Carter NS, Fairlamb AH. Polyamine and pentamidine metabolism in African trypanosomes. *Acta Tropica* 54, n° 3-4 (1993): 215-224.
- Berger, B J. Carter, N, S. Fairlamb, A, H. Characterisation of pentamidine-resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 69, n° 2 (1995): 289-298.
- Berkelhammer, G. Asato, G. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3, 4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. *Science* 162, n° 3858 (1968): 1146.
- Bisser, S. Courtioux, B. La maladie du sommeil, fin d'un épidémie? *Revue neurologique* 168, n° 3 (2012): 230-238.
- Bisser, S. Lejon, V. Preux, P, M. Bouteille, B. Stanghellini, A. Jauberteau, M, O. Büsher, P. Dumas, M. Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulins compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness. *Journal of the Neurological Sciences* 193 (2002): 127-135.
- Bisser, S. N'Siesi, F, X. Lejon, V. Preux, P, M. Van Nieuwenhove, S. Miaka Mia Bilenge, C. Büscher, P. Equivalence Trial of Melarsoprol and Nifurtimox Monotherapy and Combination Therapy for the Treatment of Second-Stage *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness. *The Journal of Infectious Diseases* 197 (2007): 322-329.
- Bitonti, A, J. McCann, P, P. Sjoerdsma, A. Necessity of antibody response in the treatment of African trypanosomiasis with alpha-difluoromethylornithine. *Biochemical Pharmacology* 35, n° 2 (1986): 331-334.
- Bitonti. A, J. Dumont, J, A. McCann, P, P. Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and methylglyoxal bis(guanyldrazone). *Biochemical journal* 237, n° 3 (1986): 685-689.

- Blum, J, A. Schmid, C. Burri, C. Clinical aspects of 2541 patients with second stage human African trypanosomiasis. *Acta Tropica* 97 (2005): 55-64.
- Blum, J. Nkunku, S. Burri, C. Clinical description of encephalopathic syndromes and risk factors for their occurrence and outcome during melarsoprol treatment of human African trypanosomiasis. *Tropical medicine & international health* 6, n° 5 (2001): 390-400.
- Boda, C. *Contribution des modèles expérimentaux dans l'étude des trypanosomoses africaines*. Thèse de doctorat, Limoges: Université de Limoges, (2005): 221.
- Bouteille, B. Chauviere, G. Implication du Megazol dans la chimiothérapie des trypanosomes. *Médecine tropicale* 59, n° 4 (1999): 321-330.
- Bouteille, B. Darde, M, L. Pestre-Alexandre, M. Efficacité du Nifurtimox sur *Trypanosoma brucei brucei* *in vitro* et *in vivo* sur souris swiss. *Bulletin de la société française de parasitologie* 6, n° 1 (1988): 15-20.
- Bouteille, B. Darde, M, L. Pestre-Alexandre, M. Action des médicaments testés en milieu acellulaire et chez la souris infectée par *Trypanosoma brucei brucei*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 81 (1988): 533-542.
- Bouteille, B. Darde, M, L. Pestre-Alexandre, M. Action of drugs tested in an acellular medium and in mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales* 81, n° 3 (1987): 533-542.
- Bouteille, B. Darde, M, L. Pestre-Alexandre, M. trypanosomose à *Trypanosoma brucei brucei*: traitement par des associations. *Bulletin de la Societe Francaise de Parasitologie* 8, n° 2 (1990): 1031.
- Bouteille, B. Marie-Daragon, A. Chauvière, G. De Albuquerque, C. Enanga, B. Dardé, M, L. Vallat, J, M. Périé, J. Dumas, M. Effect of megazol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice. *Acta Tropica* 60 (1995): 73-80.
- Bouteille, B. Millet, P. Enanga, B. Mezui Me Ndong, J. Keita, M. Jauberteau, M, O. Georges, A. Dumas, M. La trypanosomose humaine africaine, apport des modèles expérimentaux. *Parasitology* 91, n° 2 (1998): 127-132.
- Boveris, A. Sies, H. Martino, E, E. Docampo, R. Turrens, J, F. Stoppani, A, O. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal* 188, n° 3 (1980): 643-648.
- Brun, R. Blum, J. Chappuis, F. Burri, C. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375 (2010): 148–159.
- Brun, R. Schumacher, R. Schmid, C. Kunz, C. Burri, C. The phenomenon of treatment failures in Human African Trypanosomiasis. *Tropical Medicine & International Health* 6, n° 11 (2001): 906-914.
- Buguet, A. Bourdon, L. Bisser, S. Chapotot, F. Radomski, M, W. Dumas, M. Sleeping sickness: major disorders of circadian rhythm. *Médecine Tropicale* 61 (2001): 328-339.
- Burden, E, J. Schumacher, E. Kelly, M. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agent. VII. Action against subcutaneous *Trichomonas vaginalis* infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8 (1968): 538-540.
- Burri, C. Chemotherapy against human African trypanosomiasis: is there a road to success? *Parasitology* 137, n° 14 (2010): 1987-1994.

- Burri, C. Nkunku, S. Merolle, A. Smith, T. Blum, J. Brun, R. Efficacy of new, concise schedule for melarsoprol in treatment of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a randomised trial. *Lancet* 355, n° 9213 (2000): 1419-1425.
- Carter, N, S. Berger, B, J. Fairlamb, A, H. Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *The Journal of biological chemistry* 270, n° 47 (1995): 28153-28157.
- Carter, N, S. Fairlamb, A, H. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature* 361, n° 6408 (1993): 173-176.
- Carvajal, S. Pidacks, S. Steinmann, H. Maxon, H. Wozniak, A. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agent. IIX. Antiamoebic activity *in vivo* of the hydrochloride salt. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8 (1968): 541-544.
- Carvalho, S, A. da Silva, E, F. Santa-Rita, R, M. de Castro, S, L. Fraga, C, A. Synthesis and antitrypanosomal profile of new functionalized 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives, designed as non-mutagenic megazol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, n° 24 (2004): 5967-5970.
- Carvalho, S, A. Lopes, F, A. Salomão, K. Romeiro, N, C. Wardell, S, M. de Castro, S, L. da Silva, E, F. Fraga, C, A. Studies toward the structural optimization of new brazilzone-related trypanocidal 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, n° 1 (2008): 413-421.
- Cassier, P. Brugerolle, G. Combes, C. Grain, J. Raibaut, A. *Dictionnaire de parasitologie*. Paris: Ellipses, 1998.
- Chappuis, F. Loutan, L. Simarro, P. Lejon, V. Buscher, P. Options for Field Diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 18 (2005): 133-146.
- Chappuis, F. Stivalello, E. Adams, K. Kidane, S. Pittet, A. Bovier, P, A. Card agglutination test for trypanosomiasis (CATT) end-dilution titer and cerebrospinal fluid cell count as predictors of human African trypanosomiasis (*Trypanosoma brucei gambiense*) among serologically suspected individuals in southern Sudan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71 (2004): 313–317.
- Chauvière, G. Bouteille, B. Enanga, B. de Albuquerque, C. Croft, S, L. Dumas, M. Périé, J. Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous to megazol, a trypanocidal lead. *Journal of Medicinal Chemistry* 46, n° 3 (2003): 427-440.
- Chauvière, G. Rousseau, B. Pillon, F. Perie, J. Synthesis of 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-[4-3H]-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 41, n° 1 (1998): 47-51.
- Chauvière, G. Viodé, C. Périé, J. Nucleophilic substitution studies on nitroimidazoles, and applications to the synthesis of biologically active compounds. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 37, n° 1 (2000): 119-126.
- Checchi, F. Filipe, J, A, N. Haydon, D, T. Chandramohan, D. Chappuis, F. Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness. *BMC Infectious Diseases* 8 (2008): 1-10.
- Chello, P, L. Jaffe, J, J. Comparative properties of trypanosomal and mammalian thymidine kinases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 43, n° 3 (1972): 543-562.

- Clarkson, A, B, Jr. Brohn, F, H. Trypanosomiasis: an approach to chemotherapy by the inhibition of carbohydrate catabolism. *Science* 194, n° 4261 (1976): 204-206.
- Clarkson, A, B, Jr. Bienen, E, J. Bacchi, C, J. McCann, P, P. Nathan, H, C. Hutner, S, H. Sjoerdsma, A. New drug combination for experimental late-stage African trypanosomiasis: DL-alpha-Difluoromethylornithine (DFMO) with suramin. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33, n° 6 (1984): 1073-1077.
- Crozet, M, D. Botta, C. Gasquet, M. Curti, C. Rémusat, V. Hutter, S. Chapelle, O. Azas, N. De Méo, M. Vanelle, P. Lowering of 5-nitroimidazole's mutagenicity: towards optimal antiparasitic pharmacophore. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44, n° 2 (2009): 653-659.
- Cunningham, M, L. Zvelebil, M, J. Fairlamb, A, H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. *European Journal of Biochemistry* 221, n° 1 (1994): 285-295.
- Damper, D. Patton, C, L. Pentamidine transport and sensitivity in *brucei*-group trypanosomes. *Journal of protozoology* 23, n° 2 (1976): 349-356.
- Darsaud, A. Chevrier, C. Bourdon, L. Dumas, M. Buguet, A. Bouteille, B. Megazol combined with suramin improves a new diagnosis index of the early meningo-encephalitic phase of experimental African trypanosomiasis. *Tropical Medicine and International Health* 9, n° 1 (2004): 83-91.
- De Koning, H, P. Jarvis, S, M. Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta tropica* 80, n° 3 (2001): 245-250.
- De Koning, H, P. Transporters in African trypanosomes: role in drug action and resistance. *International Journal for Parasitology* 31, n° 5-6 (2001): 512-522.
- De Morais, M, A. Ferreira, R, C, C. Ferreira, L, C, S. Mutagenic activation of CL64,855, an anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivative, by bacterial nitroreductases. *Genetics and Molecular Biology* 21, n° 4 (1998): 567-572.
- Deborggraeve, S. Claes, F. Laurent, T. Mertens, P. Leclipteux, T. Dujardin, J, C. Herdewijn, P. Büscher, P. Molecular Dipstick Test for Diagnosis of Sleeping Sickness. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (2006): 2884-2889.
- Delain, E. Brack, C. Riou, G. Festy, B. Ultrastructural alterations of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast induced by the interaction of a trypanocidal drug (hydroxystilbamidine) with the kinetoplast DNA. *Journal of Ultrastructure Research* 37, n° 1 (1971): 200-218.
- Docampo, R. Moreno, S, N. Stoppani, A, O. Leon, W. Cruz, F, S. Villalta, F. Muniz, R, F. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Pharmacology* 30, n° 14 (1981): 1947-1951.
- Drennan, M, B. Stijlemans, B. Van den Abbeele, J. Quesniaux, V, J. Barkhuizen, M. Brombacher, F. De Baetselier, P. Ryffel, B. Magez, S. The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. *The Journal of Immunology* 175 (2005): 2501-2509.
- Duggan, A, J. Hutchinson, M, P. Sleeping sickness in Europeans: a review of 109 cases. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (1966): 124-131.

- Dujardin, J, C. González-Pacanowska, D. Croft, S, L. Olesen, O, F. Späth, G, F. Collaborative actions in anti-trypanosomatid chemotherapy with partners from disease endemic areas. *Trends in Parasitology* 26, n° 8 (2010): 395-403.
- Dumas, M. Bisser, S. Clinical aspects of human African trypanosomiasis. Dans *Progress in human African trypanosomiasis, sleeping sickness*, p. 215– 233. Paris: Springer Verlag: Dumas, M. Bouteille, B. Buguet, A., 1999.
- Edwards, D, I. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31, n° 1 (1993): 9-20.
- Edwards, K, J. Jenkins, T,C. Neidle, S. Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties. *Biochemistry* 31, n° 31 (1992): 7104-7109.
- Ehlhardt, W, J. Beaulieu, B, B, Jr. Goldman, P. Nitroimidazoles: highly bactericidal analogues of 5-nitroimidazole drugs. *Journal of Medicinal Chemistry* 31, n° 2 (1988): 323-329.
- Enanga, B. Ariyanayagam, M, R. Stewart, M, L. Barrett, M, P. Activity of megalzol, a trypanocidal nitroimidazole, is associated with DNA damage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, n° 10 (2003): 3368-3370.
- Enanga, B. Boudra, H. Chauvière, G. Labat, C. Bouteille, B. Dumas, M. Houin, G. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megalzol, a new potent trypanocidal drug in animals. *Arzneimittelforschung* 49, n° 5 (1999): 441-447.
- Enanga, B. Keita, M. Chauvière, G. Dumas, M. Bouteille, B. Megazol combined with suramin: a chemotherapy regimen which reversed the CNS pathology in a model of human African trypanosomiasis in mice. *Tropical Medicine & International Health* 3, n° 9 (1998): 736-741.
- Enanga, B. Labat, C. Boudra, H. Chauvière, G. Keita, M. Bouteille, B. Dumas, M. Houin, G. Simple high-performance liquid chromatographic method to analyse megalzol in human and rat plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 696, n° 2 (1997): 261-266.
- Enanga, B. Ndong, J, M. Boudra, H. Debrauwer, L. Dubreuil, G. Bouteille, B. Chauvière, G. Labat, C. Dumas, M. Périé, J. Houin, G. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megalzol in a *Trypanosoma brucei gambiense* primate model of human African trypanosomiasis Preliminary study. *Arzneimittelforschung* 50, n° 2 (2000): 158-162.
- Engelhardt, B. Wolburg, H. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *European Journal of Immunology* 34, n° 11 (2004): 2955-2963.
- Ericsson, O. Schweda, E, K. Bronner, U. Rombo, L. Fridén, M. Gustafsson, L, L. Determination of melarsoprol in biological fluids by high-performance liquid chromatography and characterisation of two stereoisomers by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 690, n° 1-2 (1997): 243-251.
- Fairlamb, A, H. Blackburn, P. Ulrich, P. Chait, B, T. Cerami, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227, n° 4693 (1985): 1485-1487.
- Fairlamb, A, H. Bowman, I, B. *Trypanosoma brucei*: maintenance of concentrated suspensions of bloodstream trypomastigotes *in vitro* using continuous dialysis for measurement of endocytosis. *Experimental parasitology* 49, n° 3 (1980): 366-380.

Fairlamb, A, H. Bowman, I, B. *Trypanosoma brucei*: Suramin and other trypanocidal compounds' effects on sn-glycerol-3-phosphate oxidase. *Experimental parasitology* 43, n° 2 (1977): 353-361.

Fairlamb, A, H. Bowman, I, B. Uptake of the trypanocidal drug suramin by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and its effect on respiration and growth rate *in vivo*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1, n° 6 (1980): 315-333.

Fairlamb, A, H. Henderson, G, B. Bacchi, C, J. Cerami, A. In vivo effects of difluoromethylornithine on trypanothione and polyamine levels in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 24, n° 2 (1987): 185-91.

Fairlamb, A, H. Henderson, G, B. Cerami, A. Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, n° 8 (1989): 2607-2611.

Ferreira, R, C. de Melo, M, E. Moraes Júnior, M, A. Ferreira, L, C. Evaluation of genotoxic activity in the blood and urine of guinea pigs treated with nifurtimox and benznidazole. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21, n° 5 (1988): 1069-1077.

Ferreira, R, C. Ferreira, L, C. Mutagenicity of CL 64855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug. *Mutation Research* 171, n° 1 (1986): 11-5.

Ferreira, R, C. Ferreira, L, C. Mutagenicity of nifurtimox and benznidazole in the *Salmonella*/microsome assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 19, n° 1 (1986): 19-25.

Ferreira, R, C. Schwarz, U. Ferreira, L, C. Activation of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs to genotoxic metabolites promoted by mammalian microsomal enzymes. *Mutation Research* 204, n° 4 (1988): 577-583.

Filardi, L, S. Brener, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 76, n° 3 (1982): 293-297.

Filardi, L, S. Brener, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81, n° 5 (1987): 755-759.

Flores-Holguín, N. Glossman-Mitnik, D. CHIH-DFT determination of the electrical, optical, and magnetic properties and NICS aromaticity of megazol. *Journal of Molecular Structure* 717, n° 1-3 (2005): 1-3.

Flores-Holguín, N. Glossman-Mitnik, D. CHIH-DFT determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet spectra of the antiparasitic drug megazol. *Journal of Molecular Structure* 681, n° 1-3 (2004): 77-82.

Flores-Holguín, N. Glossman-Mitnik, D. CHIH-DFT determination of the reactivity sites of the antiparasitic drug megazol. *Journal of Molecular Structure* 723, n° 1-3 (2005): 231-234.

Flynn, I, W. Bowman, I, B. The action of trypanocidal arsenical drugs on *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma rhodesiense*. *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry* 48, n° 2 (1974): 261-273.

Fries, D, S. Fairlamb, A, H. Antiprotozoal Agents. Dans *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development, 7th Edition, 8 Volume Set*, de D, J. Rotella, D, P. Abraham, 6416. John Wiley and Sons, Inc, 2003.

- Gahl, W, A. Pitot, H, C. Putrescine-oxidase activity in adult bovine serum and fetal bovine serum. *In Vitro* 15, n° 4 (1979): 252-257.
- Gentilini, M. Duflo, B. *Médecine Tropicale*. Édité par Flammarion. Niort: Flammarion, 1986.
- Ghoda, L. Phillips, M, A. Bass, K, E. Wang, C, C. Coffino, P. Trypanosome ornithine decarboxylase is stable because it lacks sequences found in the carboxyl terminus of the mouse enzyme which target the latter for intracellular degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 265, n° 20 (1990): 11823-11826.
- Giffin, B, F. McCann, P, P. Bitonti, A, J. Bacchi, C, J. Polyamine depletion following exposure to DL-alpha-difluoromethylornithine both *in vivo* and *in vitro* initiates morphological alterations and mitochondrial activation in a monomorphic strain of *Trypanosoma brucei brucei*. *Journal of protozoology* 33, n° 2 (1986): 238-243.
- Girault, S. Baillet, S. Horvath, D. Lucas, V. Davioud-Charvet, E. Tartar, A. Sergheraert, C. New potent inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* in the 2-aminodiphenylsulfide series. *European Journal of Medicinal Chemistry* 32, n° 1 (1997): 39-52.
- Gregus, Z. Gyurasics, A. Role of glutathione in the biliary excretion of the arsenical drugs trimelarsan and melarsoprol. *Biochemical Pharmacology* 59, n° 11 (2000): 1375-1385.
- Grishin, N, V. Osterman, A, L. Brooks, H, B. Phillips, M, A. Goldsmith, E, J. X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: the native structure and the structure in complex with alpha-difluoromethylornithine. *Biochemistry* 38, n° 46 (1999): 15174-15184.
- Gupta, M. Coffino, P. Mouse ornithine decarboxylase. Complete amino acid sequence deduced from cDNA. *The Journal of Biological Chemistry* 260, n° 5 (1985): 2941-2944.
- Hainard, A. Tiberti, N. Robin, X. Lejon, V. Ngoyi, D, M. Matovu, E. Enyaru, J, C. Fouda, C. Ndung'u, J, M. Lisacek, F. Müller, M. Turck, N. Sanchez, J, C. A combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP panel for the staging of human African trypanosomiasis patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3 (2009): 459-469.
- Haller, L. Adams, H. Merouze, F. Dago, A. Clinical and pathological aspects of human African trypanosomiasis (*T. b. gambiense*) with particular reference to reactive arsenical encephalopathy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35, n° 1 (1986): 94-99.
- Hammond, D, J. Gutteridge, W, E. Purine and pyrimidine metabolism in the *Trypanosomatidae*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 13, n° 3 (1984): 243-261.
- Henderson, G, B. Ulrich, P. Fairlamb, A, H. Rosenberg, I. Pereira, M. Sela, M. Cerami, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, n° 15 (1988): 5374-5378.
- Hess, D, A. Rieder, M, J. The role of reactive drug metabolites in immune-mediated adverse drug reactions. *The Annals of pharmacotherapy* 31, n° 11 (1997): 1378-1387.
- Hickok, N, J. Seppänen, P, J. Gunsalus, G, L. Jänne, O, A. Complete amino acid sequence of human ornithine decarboxylase deduced from complementary DNA. *DNA* 6, n° 3 (1987): 179-187.
- Hua, S, B. Li, X. Coffino, P. Wang, C, C. Rat antizyme inhibits the activity but does not promote the degradation of mouse ornithine decarboxylase in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* 270, n° 17 (1995): 10264-10271.

Hutchings, N, R. Donelson, J, E. Hill, K, L. Trypanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in African trypanosomes. *The Journal of Cell Biology* 152 (2002): 867–877.

IARC-WHO. Nitroso compounds: biological mechanisms, exposures and cancer etiology. Édité par I, K. Bartsch, H. O'Neill. *Nitroso compounds: biological mechanisms, exposures and cancer etiology*. Kailua-Kona: International agency for research on cancer, world health organization, (1991): 150.

INRS. *Fiche DEMETER Méthanol*. Document pour l'évaluation médicale des produits toxiques vis à vis de la reproduction, Institut National de Recherche et de Sécurité, 2010.

Iten, M. Mett, H. Evans, A. Enyaru, J, C. Brun, R. Kaminsky, R. Alterations in ornithine decarboxylase characteristics account for tolerance of *Trypanosoma brucei rhodesiense* to D,L-alpha-difluoromethylornithine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, n° 9 (1997): 1922-1925.

Jacobs, R, T. Nare, B. Phillips, M, A. State of the art in African trypanosome drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11, n° 10 (2011): 1255-1274.

Jaffe, J, J. McCormack, J, J. Meymarian, E. Comparative properties of schistosomal and filarial dihydrofolate reductases. *Biochemical Pharmacology* 21, n° 5 (1972): 719–731.

Jamonneau, V. Truc, P. Garcia, A. Magnus, E. Buscher, P. evaluation of LATEX/*T. b. gambiense* and alternative versions of CATT/*T. b. gambiense* for the serodiagnosis of Human African Trypanosomiasis of a population at risk in Cote d'Ivoire: considerations for mass-screening. *Acta Tropica* 76 (2000): 175-183.

Jennings, F, W. Urquhart, G, M. Murray, P, K. Miller, B, M. Treatment with suramin and 2-substituted 5-nitroimidazoles of chronic murine *Trypanosoma brucei* infections with central nervous system involvement. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77, n° 5 (1983): 693-698.

Johnstone, R, M. Sulfhydryl agents: arsenicals. Dans *Metabolic Inhibitors: A Comprehensive Treatise*, de R, M. Quastel, J, H. Hochster, 99-118. New York: Academic press, 1963.

Jordan, A, M. Tsetse-flies (*Glossinidae*). Dans *Medical insects and arachnids*, de R, P. Croskey, R, W. Lane, 333-388. London: Chapman and hall, 1993.

Kappagoda, S. Singh, U. Blackburn, B, G. Antiparasitic therapy. *Mayo clinic proceedings* 86, n° 6 (2011): 561-583.

Kapusnik, J, E. Mills, J. Antimicrobial agents annual. De P, K. Verhoef, J. Peterson, 271-281. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1987.

Kedderis, G, L. Miwa, G, T. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug Metabolism Reviews* 19, n° 1 (1988): 33-62.

Keiser, J. Ericsson, O. Burri, C. Investigations of the metabolites of the trypanocidal drug melarsoprol. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 67, n° 5 (2000): 478-488.

Keita, M. Bouteille, B. Enanga, B. Vallat, J, M. Dumas, M. *Trypanosoma brucei brucei*: a long-term model of human African trypanosomiasis in mice, meningo-encephalitis, astrocytosis, and neurological disorders. *Experimental Parasitology* 85, n° 2 (1997): 183-192.

Kennedy, P, G, E. Human African trypanosomiasis neurological aspects. *Journal of Neurology* 253 (2006): 411-416.

- Kennedy, P, G, E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *The Journal of Clinical Investigation* 113 (2004): 496-504.
- Krauth-Siegel, R, L. Enders, B. Henderson, G, B. Fairlamb, A, H. Schirmer, R, H. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *European Journal of Biochemistry* 164, n° 1 (1987): 123-128.
- Kristensson, K. nygard, M. Bertini, G. Bentivoglio, M. African trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Progress in Neurobiology* 91 (2010): 152-171.
- Kubata, B, K. Duszenko, M. Martin K, S. Urade, Y. Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends Parasitology* 23 (2007): 325–331.
- Kuzoe, F, A. Current situation of African trypanosomiasis. *Acta tropica* 54, n° 3-4 (1993): 153-162.
- Lages-Silva, E. Filardi, L, S. Brener, Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85, n° 4 (1990): 401-405.
- Lanteri, C, A. Stewart, M, L. Brock, J, M. Alibu, V, P. Meshnick, S, R. Tidwell, R, R. Barrett, M, P. Roles for the *Trypanosoma brucei* P2 transporter in DB75 uptake and resistance. *Molecular pharmacology* 70, n° 5 (2006): 1585-1592.
- Layton, H, W. Bachmann, H, J. Kemp, G, A. Gale, G, O. Kiser, J, S. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agent. V. Therapy of an experimental *Salmonella choleraesuis* infection in swine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8 (1968): 528-533.
- Le Trant, N. Meshnick, S, R. Kitchener, K. Eaton, J, W. Cerami, A. Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification, characterization, and similarity to Leishmanial and trypanosomal enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 258, n° 1 (1983): 125-30.
- Lechat, P. *Pharmacologie*. Paris: Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, 2006.
- Lejon, V. Buscher, P. Magnus, E. Moons, A. Wouters, I. Van Meirvenne, N. A semi-quantitative ELISA for detection of *Trypanosoma brucei gambiense* specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients. *Acta Tropica* 69 (1998): 151-164.
- Lejon, V. Reiber, H. Legros, D. Djé, N. Magnus, E. Wouters, I. Sindic, C, J. Büscher, P. Intrathecal immune response pattern for improved diagnosis of central nervous system involvement in trypanosomiasis. *Journal of Infectious Diseases* 187 (2003): 1475-83.
- Leone, M, J. Marpegan, L. Bekinschtein, T, A. Costas, M, A. Golombek, D, A. Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling. *Journal of Neuroscience Research* 84 (2006): 1521–1527.
- Lindmark, D, G, Müller, M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10, n° 3 (1976): 476-482.
- Liu, Y. Tidwell, R, R. Leibowitz, M, J. Inhibition of *in vitro* splicing of a group I intron of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 41, n° 1 (1994): 31-38.
- Loichot, C. Grimat, M. *Métabolisme des médicaments*. Strasbourg: Faculté de Médecine de Strasbourg, 2004.

- Loiseau, P, M. Lubert, P. Wolf, J, G. Contribution of dithiol ligands to *in vitro* and *in vivo* trypanocidal activities of dithiaarsanes and investigation of ligand exchange in an aqueous solution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, n° 11 (2000): 2954-2961.
- Louis, F, J. Simarro, P, P. Les difficiles débuts de la lutte contre la maladie du sommeil en Afrique équatoriale française. *Médecine tropicale* 65 (2005): 251-257.
- Lumsden, W, G, R. Kimber, C, D. Evans, D, A. Doigs, J. *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation for detection of low parasitemias: adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73 (1979): 313-317.
- Lundkvist, G, B. Kristensson, K. Bentivoglio, M. Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology (Bethesda)* 19 (2004): 198-206.
- Mansfield, J, M. Paulnock, D, M. Genetic manipulation of African trypanosomes as a tool to dissect the immunobiology of infection. *Parasite Immunology* 30 (2008): 245-253.
- Mansfield, J, M. Paulnock, D, M. Regulation of innate and acquired immunity in African trypanosomiasis. *Parasite Immunology* 27 (2005): 361-371.
- Marie-Daragon, A. Rouillard, M, C. Bouteille, B. Bisser, S. de Albuquerque, C. Chauvière, G. Périé, J. Dumas, M. An efficacy trial on *Trypanosoma brucei brucei* of molecules permeating the blood-brain barrier and of megalozol. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 87, n° 5 (1994): 347-352.
- Mäser, P. Sütterlin, C. Kralli, A. Kaminsky, R. A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science* 285, n° 5425 (1999): 242-244.
- Masocha, W. Robertson, B. Rottenberg, M, E. Mhlanga, J. Sorokin, L. Kristensson, K. Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define *Trypanosoma brucei brucei* penetration of the blood-brain barrier. *The Journal of Clinical Investigation* 114 (2004): 689-694.
- Matthews, K, R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* 118 (2005): 283-290.
- Maya, J, D. Bollo, S. Nuñez-Vergara, L, J. Squella, J, A. Repetto, Y. Morello, A. Périé, J. Chauvière, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. *Biochemical Pharmacology* 65, n° 6 (2003): 999-1006.
- Metcalf, B, W. Bey, P. Danzin, C. Jung, M, J. Casara, P. Vever, J, P. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.17) by substrate and product analogs. *Journal of the American Chemical Society* 100, n° 8 (1978): 2551-2553.
- Meyskens, F, L, Jr. Gerner, E, W. Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clinical Cancer Research* 5, n° 5 (1999): 945-951.
- Moore, S. Shrestha, S. Tomlinson, K, W. Vuong, H. Predicting the effect of climate change on African trypanosomiasis: integrating epidemiology with parasite and vector biology. *Journal of the Royal Society Interface* 9, n° 70 (2012): 817-830.
- Morello, A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 90, n° 1 (1988): 1-12.

- Morty, R, E. Troeberg, L. Pike, R, N. Jones, R. Nickel, P. Lonsdale-Eccles, J, D. Coetzer, T, H. A trypanosome oligopeptidase as a target for the trypanocidal agents pentamidine, diminazene and suramin. *FEBS Letters* 433, n° 3 (1998): 251-256.
- Mulcahy, R, T. Gipp, J, J. Ublacker, G, A. Panicucci, R. McClelland, R, A. Cytotoxicity and glutathione depletion by 1-methyl-2-nitrosoimidazole in human colon cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 38, n° 10 (1989): 1667-1671.
- Nathan, H, C. Bacchi, C, J. Hutner, S, H. Rescigno, D. McCann, P, P. Sjoerdsma, A. Antagonism by polyamines of the curative effects of alpha-difluoromethylornithine in *Trypanosoma brucei brucei* infections. *Biochemical Pharmacology* 30, n° 21 (1981): 3010-3013.
- Nau, R. Sörgel, F. Prange, H, W. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of bacterial central nervous system infections. *Clinical Pharmacokinetics* 35, n° 3 (1998): 223-246.
- Neal, R, A. *The Leishmaniases in Biology and Medicine/Clinical Aspects and Control*. Vol. 2, chez *The Leishmaniases in Biology and Medicine/Clinical Aspects and Control*, de W. Killick- Kendrick, R. Peters, 793-845. Londres: Academic Press, 1987.
- Nesslany, F. Brugier, S. Mouriès, M, A. Le Curieux, F. Marzin, D. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by meglumine. *Mutation research* 560, n° 2 (2004): 147-158.
- Nikolskaia, O, V. de A Lima, A, P. Kim, Y, V. Lonsdale-Eccles, J, D. Fukuma, T. Scharfstein, J. Grab, D, J. Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *The Journal of Clinical Investigation* 116 (2006): 2739-2747.
- Njiokou, F. Laveissière, C. Simo, G. Nkinin, S. Grébaud, P. Cuny, G. Herder, S. Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infection, Genetics and Evolution* 6 (2006): 147-153.
- Odiit, M. Kansime, F. Enyaru, J, C. Duration of symptoms and case fatality of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense* in Tororo, Uganda. *East African Medical Journal* 12 (1997): 792-795.
- OMS. *La trypanosomiase africaine : lutte et surveillance. Rapport d'un comité d'experts de l'OMS*. Série de Rapports techniques, Organisation mondiale de la Santé, Genève: 1998.
- Opperdoes, F, R. Baudhuin, P. Coppens, I. De Roe, C. Edwards, S, W. Weijers, P, J. Misset, O. Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Cell Biology* 98, n° 4 (1984): 1178-1184.
- Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, O. Mezui-Me-Ndong, J. Boda, C. Lamine, I. Labrousse, F. Bisser, S. Bouteille, B. The vervet monkey (*Chlorocebus aethiops*) as an experimental model for *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a clinical, biological and pathological study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100, n° 5 (2006): 427-436.
- Owens, T. Bechmann, I. Engelhardt, B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 67 (2008): 1113-1121.
- Pal, A. Hall, B, S. Field, M, C. Evidence for a non-LDL-mediated entry route for the trypanocidal drug suramin in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 122, n° 2 (2002): 217-221.

- Papadopoulos, M, C. Abel, P, M. Agranoff, D. Stich, A. Tarelli, E. Bell, B, A. Planche, T. Loosemore, A. Saadoun, S. Wilkins, P. Krishna, S. A novel and accurate diagnostic test for human African trypanosomiasis. *Lancet* 363 (2004): 1358-1363.
- Park, B, K. Kitteringham, N, R. Drug-protein conjugation and its immunological consequences. *Drug Metabolism Reviews* 22, n° 1 (1990): 87-144.
- Patterson, S. Alphey, M, S. Jones, D, C. Shanks, E, J. Street, I, P. Frearson, J, A. Wyatt, P, G. Gilbert, I, H. Fairlamb, A, H. Dihydroquinazolines as a novel class of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase inhibitors: discovery, synthesis, and characterization of their binding mode by protein crystallography. *Journal of Medicinal Chemistry* 54, n° 19 (2011): 6514-6530.
- Penchenier, L. Grebaut, P. Njokou, F. Eboo Eyenga, V. Buscher, P. Evaluation of LATEX/ *T. b. gambiense* for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in central Africa. *Acta Tropica* 85 (2003): 31-37.
- Pentreath, V, W. Cookson, M, R. Ingram, G, A. Mead, C. Alafiatayo, R, A. *Trypanosoma brucei* products activate components of the reactive response in astrocytes *in vitro*. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 87 (1994): 323-329.
- Pepin, J. Milord, F. African trypanosomiasis and drug-induced encephalopathy: risk factors and pathogenesis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85, n° 2 (1991): 222-224.
- Pepin, J. Milord, F. Khonde, A, N. Niyonsenga, T. Loko, L. Mpia, B. De Wals, P. Risk factors for encephalopathy and mortality during melarsoprol treatment of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89, n° 1 (1995): 92-97.
- Pépin, J. Milord, F. The treatment of human African trypanosomiasis. *Advances in Parasitology* 33 (1994): 1-47.
- Pepin, J. The Treatment of Human African Trypanosomiasis. *Advances In Parasitology* 33 (1994): 1-47.
- Peregrine, A, S. Mamman, M. Pharmacology of diminazene: a review. *Acta tropica* 54, n° 3-4 (1993): 185-203.
- Perie, J. Viode, C. De Albuquerque, C. Chauviere, G. HoueeLevin, C. Cenas. N. Krauth-Siegel, R, L. Comparative bioreductive activities of nifurtimox and Megazol; Enzymatic and pulse radiolysis studies. *Tropical medicine & international health* 1, n° 6 (1996): 21.
- Peters, W. Gilles, H, M. *A colour atlas of tropical medicine and parasitology*. 1977 pp. 416 pp. London: Wolfe Publishing, 1977.
- Phillips, M, A. Coffino, P. Wang, C, C. Cloning and sequencing of the ornithine decarboxylase gene from *Trypanosoma brucei*. Implications for enzyme turnover and selective difluoromethylornithine inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* 262, n° 18 (1987): 8721-8727.
- Phillips, M, A. Coffino, P. Wang, C, C. *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase: enzyme purification, characterization, and expression in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 263, n° 34 (1988): 17933-17941.
- Phillips, M, A. Wang, C, C. A *Trypanosoma brucei* mutant resistant to alpha-difluoromethylornithine. *Molecular and Biochemical Parasitology* 22, n° 1 (1987): 9-17.

- Picozzi, K. Fevre, E. M. Odiit, M. Carrington, M. Eisler, M. C. Maudlin, I. Welburn, S. C. Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *British Medical Journal* 331 (2005): 1238-1241.
- Poli, P. Aline de Mello, M. Buschini, A. Mortara, R. A. Northfleet de Albuquerque, C. da Silva, S. Rossi, C. Zucchi, T. M. Cytotoxic and genotoxic effects of meglumine, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. *Biochemical Pharmacology* 64, n° 11 (2002): 1617-1627.
- Poltera, A. A. Sayer, P. D. Brighthouse, G. Bovell, D. Rudin, W. Immunopathological aspects of trypanosomal meningoencephalitis in vervet monkeys after relapse following Berenil treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79 (1985): 527-531.
- Portella, R. S. Andrade, S. G. *Trypanosoma cruzi*: parasite antigens sequestered in heart interstitial dendritic cells are related to persisting myocarditis in benznidazole-treated mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, n° 7 (2009): 1023-1030.
- Poulin, R. Lu, L. Ackermann, B. Bey, P. Pegg, A. E. Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *The Journal of Biological Chemistry* 267, n° 1 (1992): 150-158.
- Priotto, G. Kasparian, S. Mutombo, W. Ngouama, D. Ghorashian, S. Arnold, U. Ghabri, S. Baudin, E. Buard, V. Kazadi-Kyanza, S. Ilunga, M. Mutangala, W. Pohl, G. Schmid, C. Karunakara, U. Torreele, E. Kande, V. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *The Lancet* 374, n° 9683 (2009): 56-64.
- Priotto, G. Pinoges, L. Fursa, I. B. Burke, B. Nicolay, N. Grillet, G. Hewison, C. Balasegaram, M. Safety and effectiveness of first line eflornithine for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Sudan: cohort study. *British Medical Journal* 336, n° 7646 (2008): 705-708.
- Quemener, V. Blanchard, Y. Chamaillard, L. Havouis, R. Cipolla, B. Moulinoux, J. P. Polyamine deprivation: a new tool in cancer treatment. *Anticancer Research* 14, n° 2A (1994): 443-448.
- Quenneville, Y. Desmarteaux, D. Durocher, Y. Méthode plus efficiente et plus productive de transfection à grande échelle de cellules CHO. *Conseil national de recherches du Canada*, (2009): L-11992.
- Raivich, G. Banati, R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Research Reviews* 46 (2004): 261-281.
- Rakesh, K. Agrawal, D. K. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 70 (2005): 649-657.
- Reboldi, A. Coisne, C. Baumjohann, D. Benvenuto, F. Bottinelli, D. Lira, S. Uccelli, A. Lanzavecchia, A. Engelhardt, B. Sallusto, F. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature Immunology* 10 (2009): 514-523.
- Rechsteiner, M. Rogers, S. W. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 21, n° 7 (1996): 267-271.
- Redin, G. S. Kuck, N. A. Forbes, M. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agent. VI. Antibacterial efficacy in mice and in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8 (1968): 534-537.

- Reincke, M. Arlt, W. Heppner, C. Petzke, F. Chrousos, GP. Allolio, B. Neuroendocrine dysfunction in African trypanosomiasis. The role of cytokines. *The New York Academy of Sciences* 840 (1998): 809-821.
- Riente, R, R. Souza, V, P. Carvalho, S, A. Kaiser, M. Brun, R. da Silva E, F. Leishmanicidal activity of new megazol derivatives. *Medicinal Chemistry* 5, n° 4 (2009): 392-397.
- Robays, J. Bilengue, M, M. Stuyft, P, V. Boelaert, M. The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Tropical Medicine & International Health* 9 (2004): 542–550.
- Roberts SC, Scott, J. Gasteier, J, E. Jiang, Y. Brooks, B. Jardim, A. Carter, N, S. Heby, O. Ullman, B. S-adenosylmethionine decarboxylase from *Leishmania donovani*. Molecular, genetic, and biochemical characterization of null mutants and overproducers. *The journal of biochemical chemistry* 277, n° 8 (2002): 5902-5909.
- Rodriguez, J, B. Gros, E, G. Recent developments in the control of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent for Chagas' disease. *Current Medicinal Chemistry* 2, n° 3 (1995): 723-742.
- Rogers D, J. Randolph S, E. Studying the global distribution of infectious diseases using GIS and RS. *Nature Reviews Microbiology* 1, n° 3 (2003): 231-237.
- Rogers, D, J. Trypanosomiasis “risk” or “challenge”. *Acta tropica* 42 (1985): 5-23.
- Rogers, S. Wells, R. Rechsteiner, M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, n° 4774 (1986): 364-368.
- Romanha, A, J. Castro, S, L. Soeiro Mde, N. Lannes-Vieira, J. Ribeiro, I. Talvani, A. Bourdin, B. Blum, B. Olivieri, B. Zani, C. Spadafora, C. Chiari, E. Chatelain, E. Chaves, G. Calzada J, E. Bustamante, J, M. Freitas-Junior, L, H. Romero, L, I. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, n° 2 (2010): 233-238.
- Rosenkranz, H, S. Speck, W, T. Mutagenicity of metronidazole: activation by mammalian liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 66, n° 2 (1975): 520-525.
- Rosselli, F, P. Albuquerque, C, N. Da Silva, A, B. A chemometric study of megazol derivatives with activity against *Trypanosoma equiperdum*. *SAR & QSAR in Environmental Research* 17, n° 6 (2006): 533-547.
- Rosselli, F, P. Albuquerque, C, N. Da Silva, A, B. Quantum chemical and statistical study of megazol-derived compounds with trypanocidal activity. *International Journal of Quantum Chemistry* 103, n° 5 (2005): 738–748.
- Salomão, K. de Souza, E, M. Carvalho, S, A. da Silva, E, F. Fraga, C, A. Barbosa, H, S. de Castro, S, L. *In vitro* and *in vivo* activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of megazol against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, n° 5 (2010): 2023-2031.
- Sands, M. Kron, M,A. Brown, R, B. Pentamidine: a review. *Reviews of Infectious Diseases* 7, n° 5 (1985): 625-634.
- Sauvage, F, L. Saint-Marcoux, F. Duret, B. Deporte, D. Lachatre, G. Marquet, P. Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 52, n° 9 (2006): 1735-1742.

- Sekis, I. Ramstead, K. Rishniw, M. Schwark, W. S. McDonough, S. P. Goldstein, R. E. Papich, M. Simpson K, W. Single-dose pharmacokinetics and genotoxicity of metronidazole in cats. *Journal of Feline Medicine & Surgery* 11, n° 2 (2009): 60-68.
- Shapiro, T, A. Englund, P, T. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, n° 3 (1990): 950-954.
- Simarro, P, P. Diarra, A. Ruiz Postigo, J, A. Franco, J, R. Jannin, J, G. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, n° 2 (2011): e1007.
- Simarro, P, P. Louis, F, J. Jannin, J. Sleeping sickness, forgotten illness: what are the consequences in the field? *Médecine Tropicale* 63 (2003): 231–235.
- Smith, D, H. Pépin, J. Stich, A, H, R. Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis. *British Medical Journal*, (1998): 341-355.
- Sokolova, A, Y. Wyllie, S. Patterson, S. Oza, S, L. Read, K, D. Fairlamb, A, H. Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, n° 7 (2010): 2893-2900.
- Stevens, J, R. Brisse, S. Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance. Dans *The trypanosomiasis*, de I. Holmes, P, H. Miles, M, A. Maudlin, 1-23. Wallingford: CABI Publishing, 2004.
- Steverding, D. A new initiative for the development of new diagnostic tests for human african trypanosomiasis. *Kinetoplastid biology* 5 (2006): 1-3.
- Steverding, D. The history of African trypanosomiasis. *Parasites & Vectors* 1 (2008): 1-8.
- Stijlemans, B. Guillems, M. Raes, G. Beschim, A. Magez, S. De Baetselier, P. African trypanosomiasis: from immune escape and immunopathology to immune intervention. *Veterinary Parasitology* 148 (2007): 3-13.
- Take, Y. Inouye, Y. Nakamura, S. Allaudeen, H, S. Kubo, A. Comparative studies of the inhibitory properties of antibiotics on human immunodeficiency virus and avian myeloblastosis virus reverse transcriptases and cellular DNA polymerases. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* 42, n° 1 (1989): 107-115.
- Temperton, N, J. Wilkinson, S, R. Kelly J, M. Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 76, n° 1-2 (1996): 339-343.
- Temperton, N, J. Wilkinson, S, R. Meyer, D, J. Kelly, J, M. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Molecular and Biochemical Parasitology* 96, n° 1-2 (1998): 167-176.
- Torreele, E. Bourdin Trunz, B. Tweats, D. Kaiser, M. Brun, R. Mazué, G. Bray, M, A. Pécou, B. Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, n° 12 (2010): e923.
- Trinquier, M. Perie, J. Callens, M. Opperdoes, F. Willson, M. Specific inhibitors for the glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 3, n° 11 (1995): 1423-1427.

- Turrens, J, F. Watts, B, P, Jr. Zhong, L. Docampo, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Molecular and Biochemical Parasitology* 82, n° 1 (1996): 125-129.
- Tweats, D. Bourdin Trunz, B. Torreele, E. Genotoxicity profile of fexinidazole a drug candidate in clinical development for human African trypanomiasis (sleeping sickness). *Mutagenesis*, (2012): Publication électronique avant impression.
- Vaidya, T. Bakhiet, M. Hill, K, L. Olsson, T. Kristensson, K. Donelson, J, E. The gene for a T lymphocyte triggering factor from African trypanosomes. *The Journal of Experimental Medicine* 186 (1997): 433-438.
- Van Schaftingen, E. Opperdoes, F, R. Hers, H, G. Effects of various metabolic conditions and of the trivalent arsenical melarsen oxide on the intracellular levels of fructose 2,6-bisphosphate and of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. 166, n° 3 (1987): 653-661.
- Vansterkenburg, E,L. Coppens, I. Wilting, J. Bos, O, J. Fischer, M, J. Janssen, L, H. Opperdoes, F, R. The uptake of the trypanocidal drug suramin in combination with low-density lipoproteins by *Trypanosoma brucei* and its possible mode of action. *Acta tropica* 54, n° 3-4 (1993): 237-250.
- Vickerman, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *British Medical Bulletin* 41 (1985): 105-114.
- Viode, C. Albuquerque, C De. Chauviere, G. Houee-Levin, C. Perie, J. Comparative study by pulse radiolysis of the radical anion derived from compounds used in Chagas' disease therapy. *New Journal of Chemistry* 21, n° 12 (1997): 1331-1338.
- Viode, C. Bettache, N. Cenas, N. Krauth-Siegel, R, L. Chauvière, G. Bakalara, N. Périé, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochemical Pharmacology* 57, n° 5 (1999): 549-557.
- Viode, C. *Étude physicochimique et biochimique de la réduction d'hétérocycles nitrés, en relation avec les enzymes du métabolisme de l'oxygène = Physicochemical and biochemical study of nitro-heterocycles reduction, in relationship with oxygen metabolism enzymes*. Vol. 98 TOU3 0074. Toulouse: Université de Toulouse, 1998.
- Walton, J, G. Jones, D, C. Kiuru, P. Durie, A, J. Westwood, N, J. Fairlamb, A, H. Synthesis and evaluation of indatraline-based inhibitors for trypanothione reductase. *ChemMedChem* 6, n° 2 (2011): 321-328.
- Watanabe, M. Nishino, T. Takio, K. Sofuni, T. Nohmi, T. Purification and characterization of wild-type and mutant classical nitroreductases of *Salmonella typhimurium*. L33R mutation greatly diminishes binding of FMN to the nitroreductase of *S. typhimurium*. *The Journal of Biological Chemistry* 273, n° 37 (1998): 23922-23928.
- Welburn, D. Picozzi, K. Fèvre, E, M. Coleman, P, G. Odiit, M. Carrington. Maudlin, I. Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum resistance associated (SRA) gene. *The Lancet* 358 (2001): 2017-2019.
- Whitelaw, D, D. Gardiner, P, R. Murray, M. Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. *Parasitology* 97, n° 1 (1988): 51-61.
- Willson, M. Callens, M. Kuntz, D ,A. Périé, J. Opperdoes, F, R. Synthesis and activity of inhibitors highly specific for the glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 59, n° 2 (1993): 201-210.

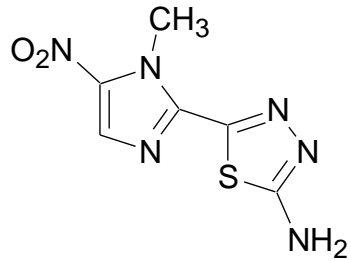
Wilson, Ray. Ray Wilson bird and wildlife photography. *raywilsonbirdphotography.co.uk*. 01 09 2009. http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/000_invert_images/vector_images/2009-09-01-JS8Q3305.jpg (accès le 05 16, 2012).

Winkelmann, E. Raether, W. Gebert, U. Sinharay, A. Chemotherapeutically active nitro compounds. 4. 5-Nitroimidazoles (Part I). *Arzneimittelforschung* 27, n° 12 (1977): 2251-2263.

Woo, P, T. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Tropica* 27 (1970): 384-386.

Annexes

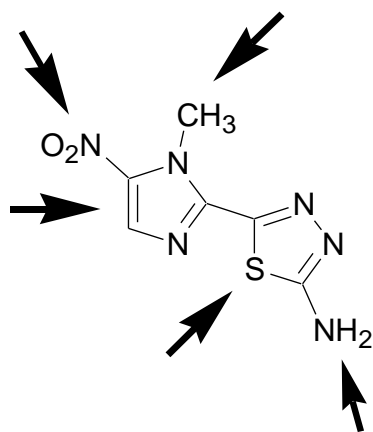
Annexe 1 : m/z 227 ; Mégazol



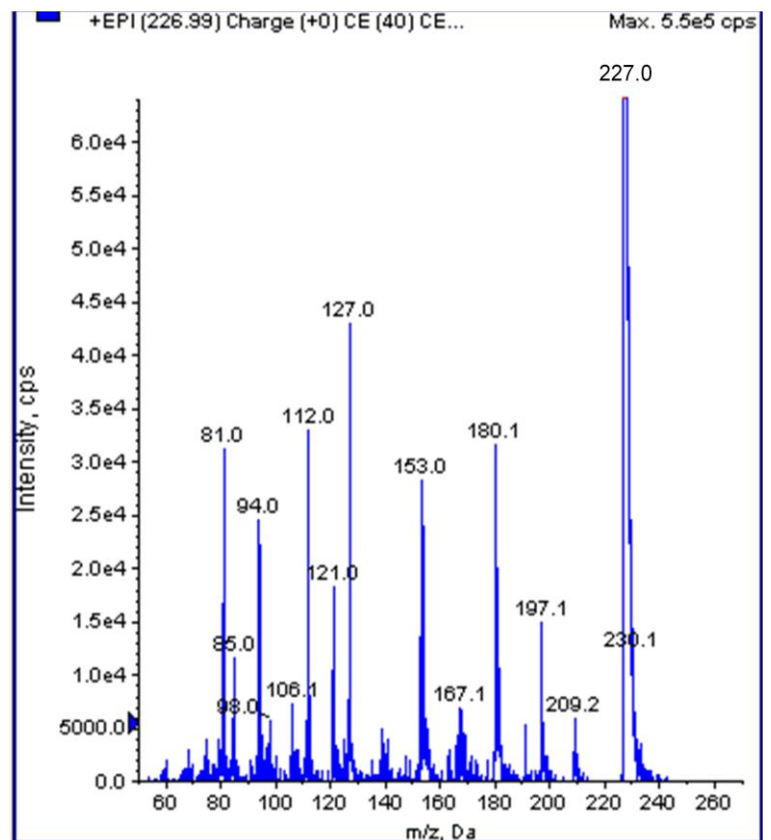
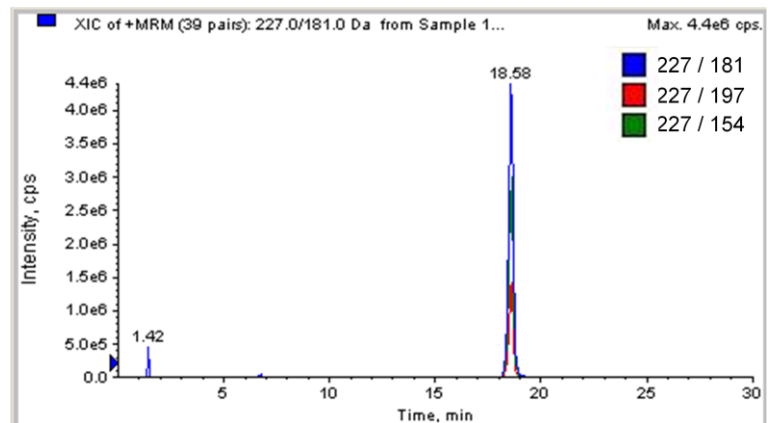
$C_6H_6N_6SO_2$ MM 226

$[M+H]^+$ m/z 227

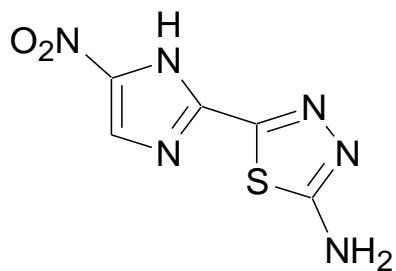
R_t 18.58



Cibles métaboliques



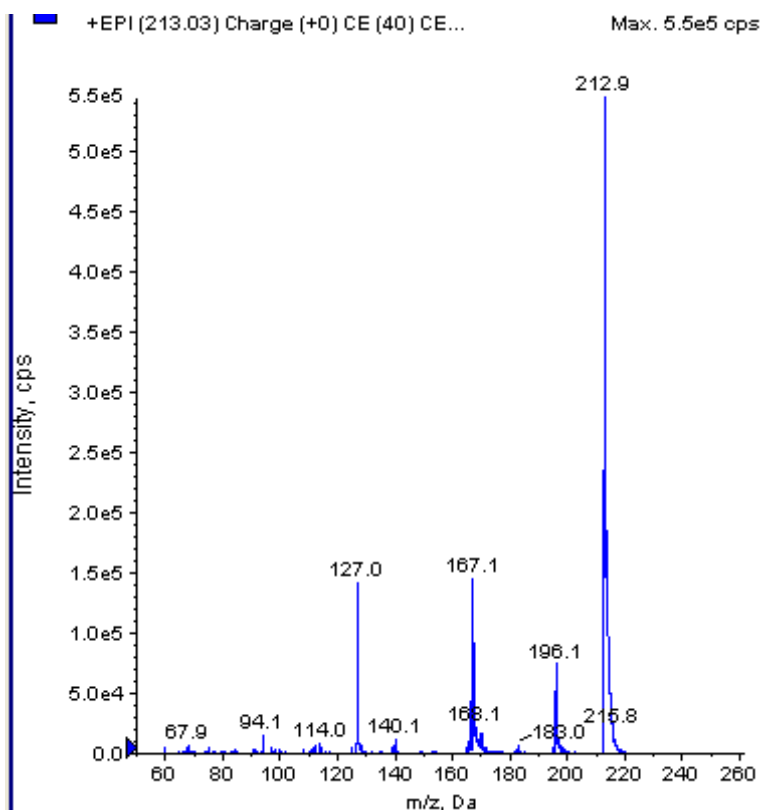
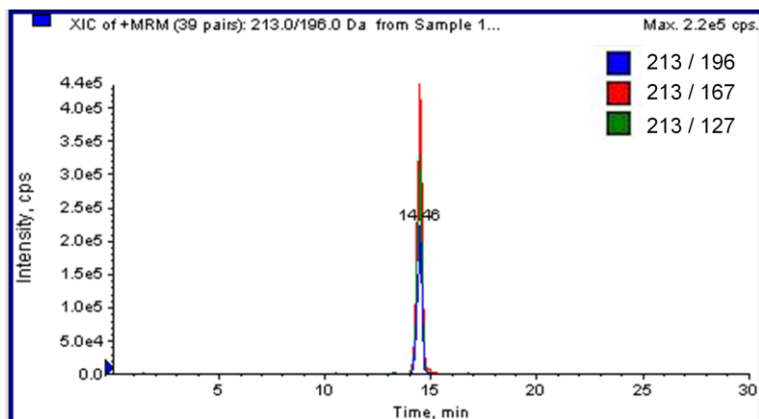
Annexe 2 : m/z 213 ; Mégazol déméthylé



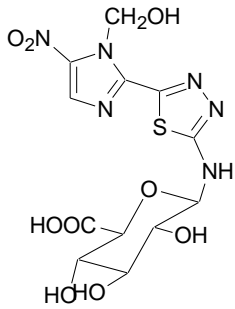
$C_5H_4N_6SO_2$ MM 212

$[M+H]^+$ m/z 213

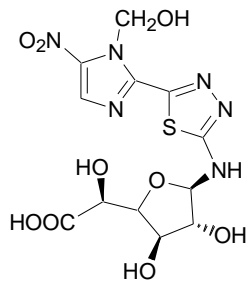
R_t 14.46



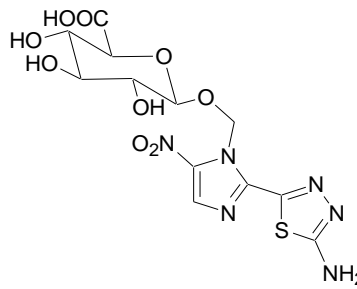
Annexe 3 : m/z 419 ; 4 hypothèses, 2 isomères



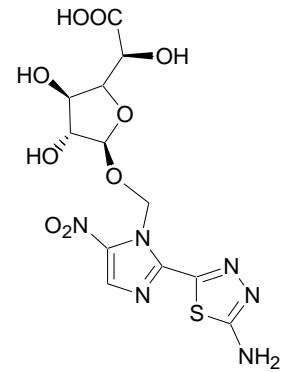
$C_{12}H_{14}N_6SO_9$ MM 418
 $[M+H]^+$ m/z 419
 R_t 12.20 ou 14.74



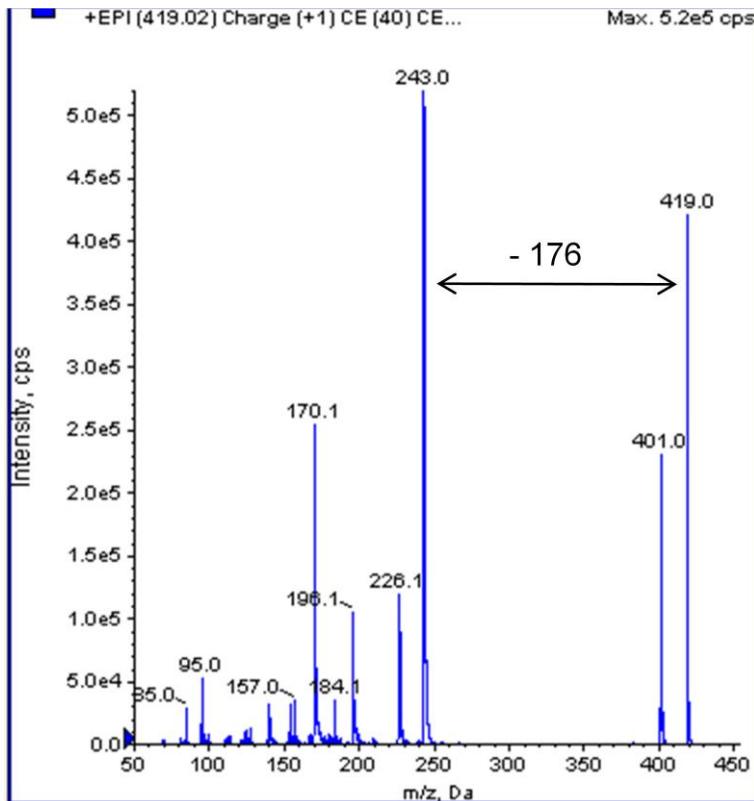
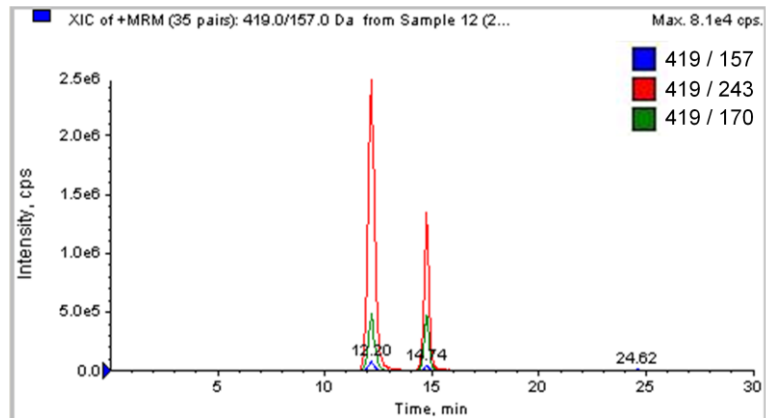
$C_{12}H_{14}N_6SO_9$ MM 418
 $[M+H]^+$ m/z 419
 R_t 12.20 ou 14.74



$C_{12}H_{14}N_6SO_9$ MM 418
 $[M+H]^+$ m/z 419
 R_t 12.20 ou 14.74

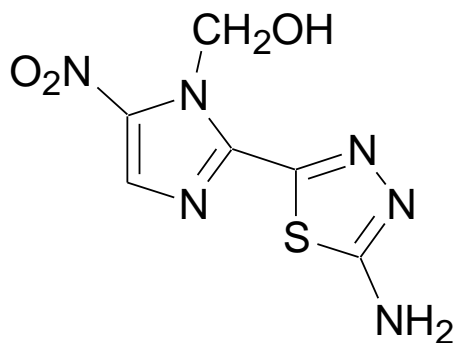


$C_{12}H_{14}N_6SO_9$ MM 418
 $[M+H]^+$ m/z 419
 R_t 12.20 ou 14.74



Les deux pics ont le même spectre de fragmentation

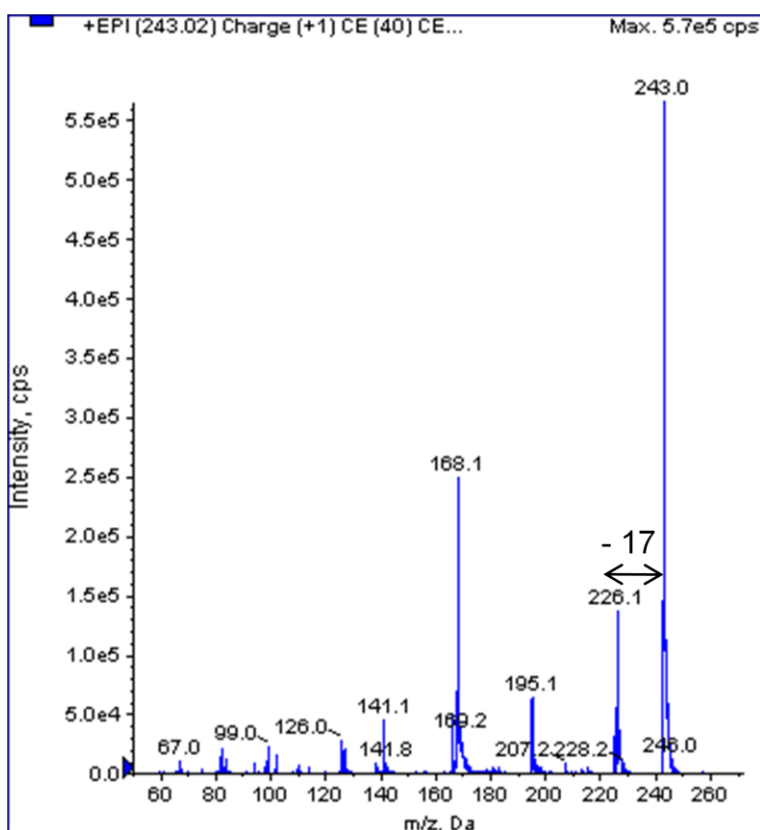
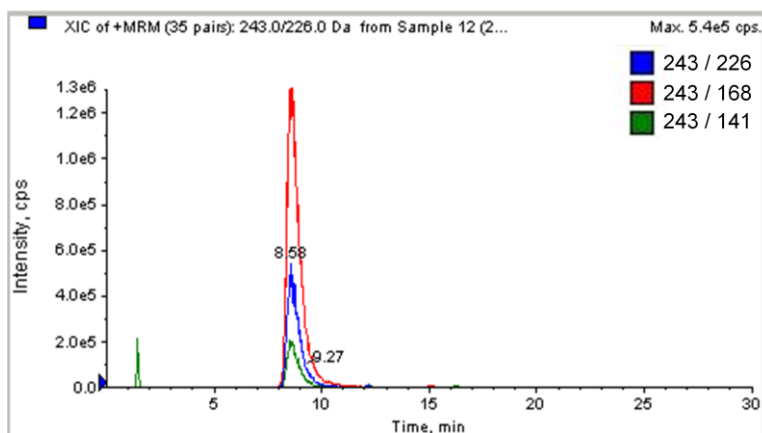
Annexe 4 : m/z 243 (TR :8,9 min) Hydroxy-Mégazol



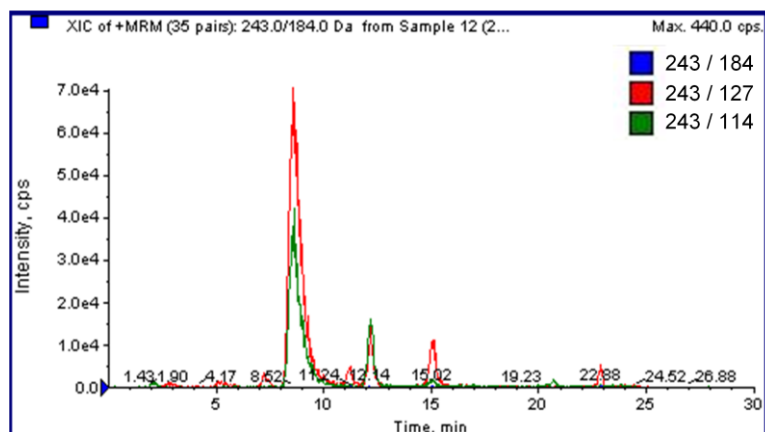
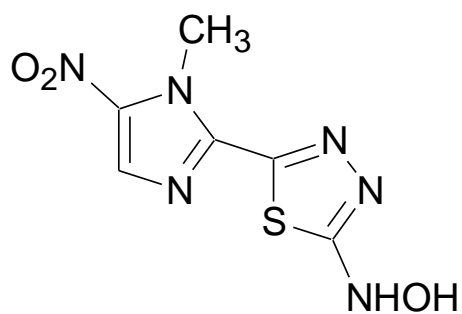
$C_6H_6N_6SO_3$ MM 242

$[M+H]^+$ m/z 243

R_t 8.58



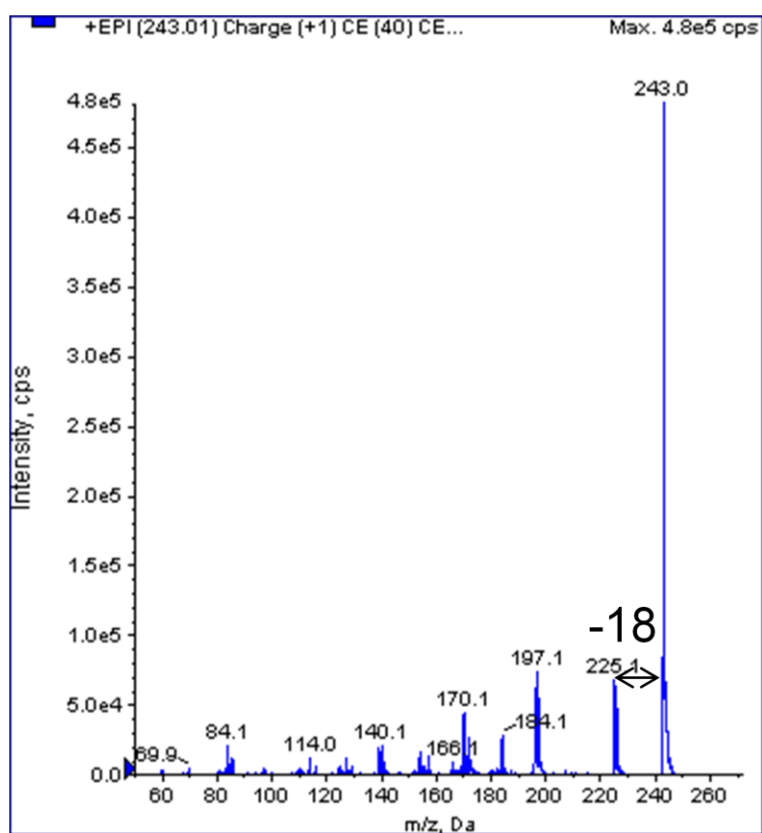
Annexe 5 : m/z 243 (TR 12,2min) Hydroxylamine-Mégazol



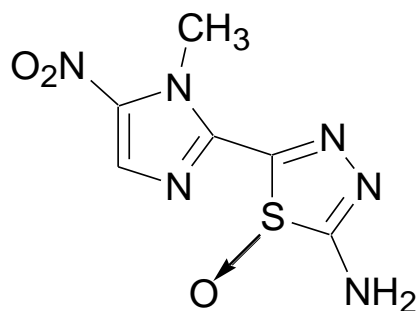
$C_6H_6N_6SO_3$ MM 242

$[M+H]^+$ m/z 243

R_t 12.14



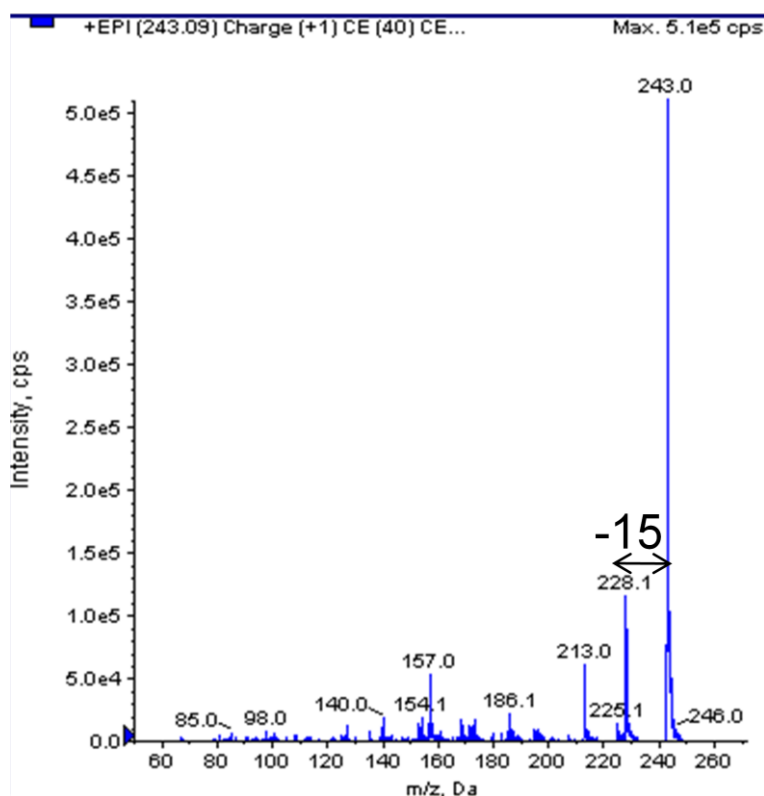
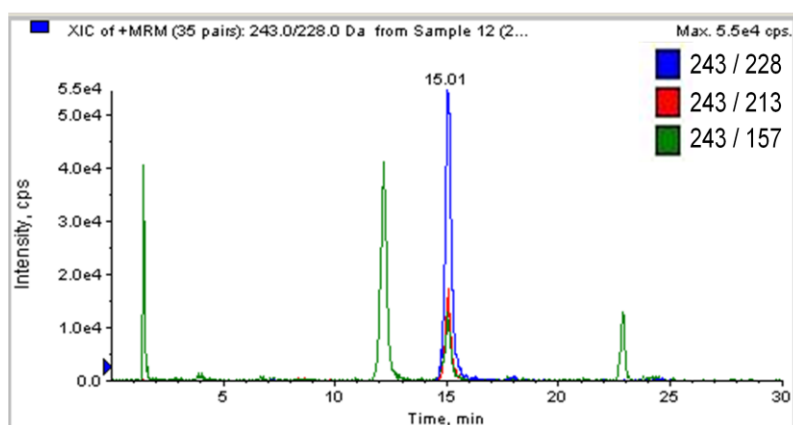
Annexe 6 : m/z 243 (TR 14,1 min) Sulfoxy-Mégazol



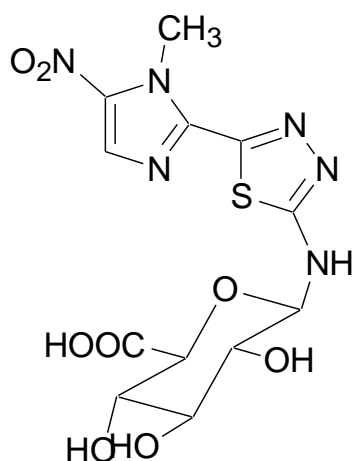
$C_6H_6N_6SO_3$ MM 242

$[M+H]^+$ m/z 243

R_t 15.03



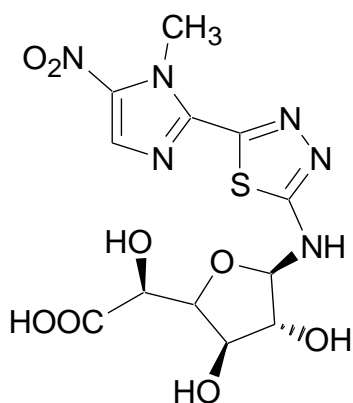
Annexe 7 : m/z 403 ; 2 hypothèses



$C_{12}H_{14}N_6SO_8$ MM 402

$[M+H]^+$ m/z 403

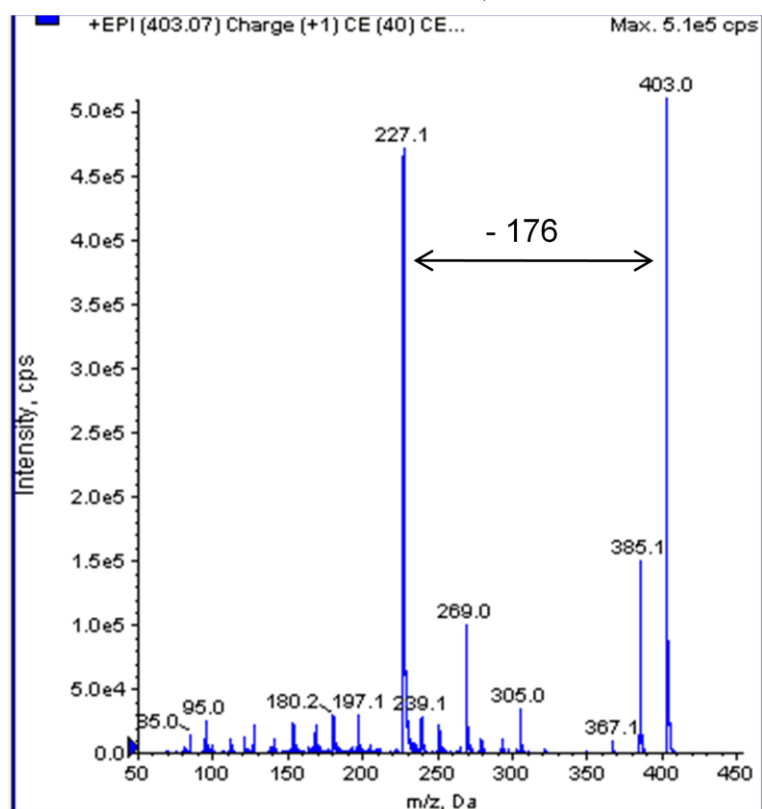
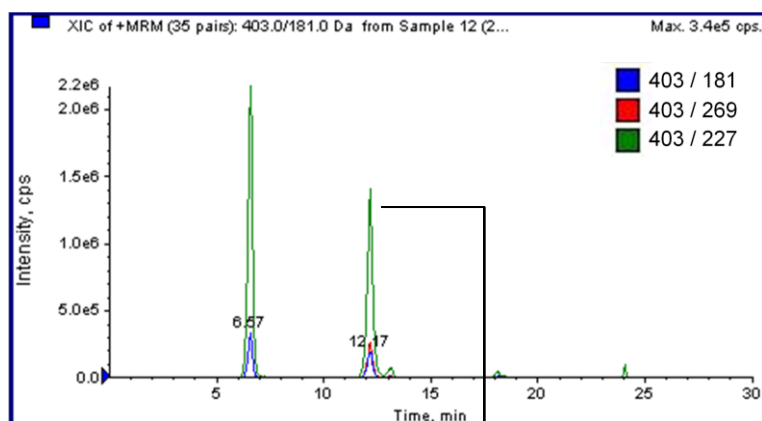
R_t 6.57 ou 12.17



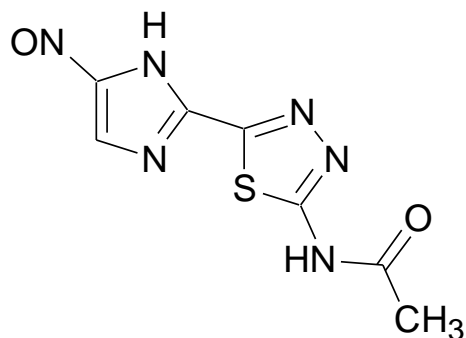
$C_{12}H_{14}N_6SO_8$ MM 402

$[M+H]^+$ m/z 403

R_t 6.57 ou 12.17



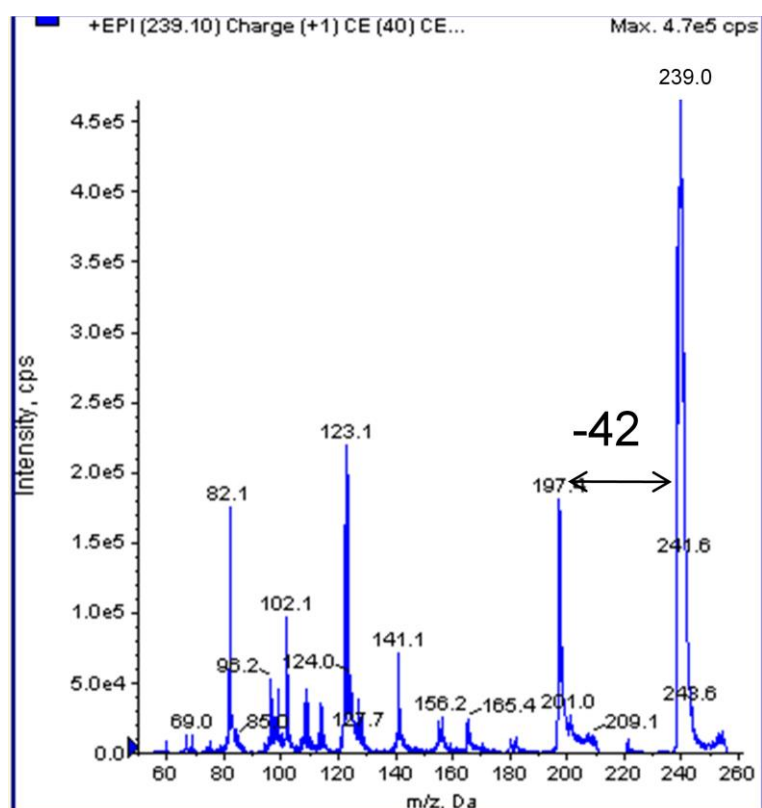
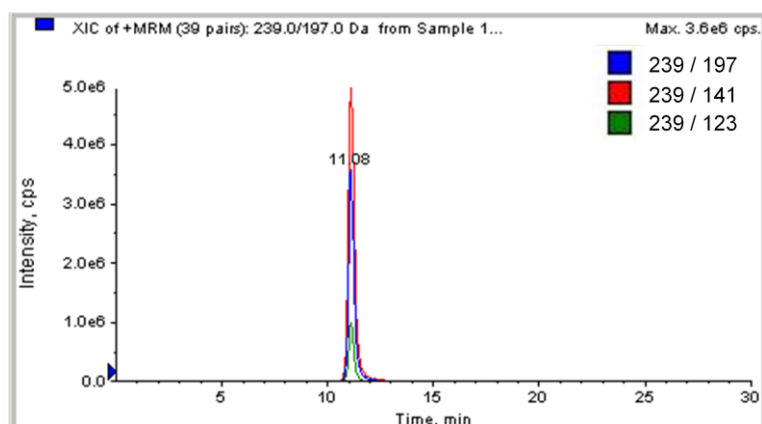
Annexe 8 : m/z 239 ; Nitroso-déméthyl-Mégazol-acétylé,



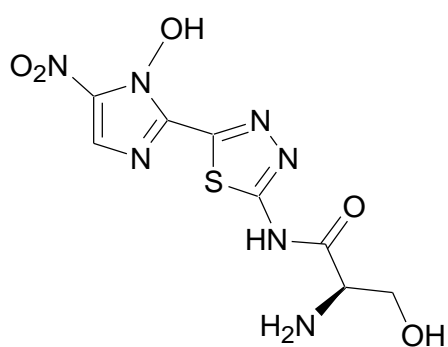
$C_7H_6N_6SO_2$ MM 238

$[M+H]^+$ m/z 239

R_t 11.08



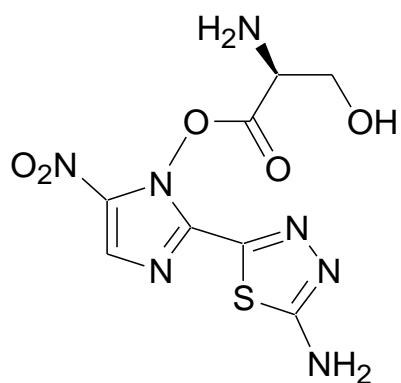
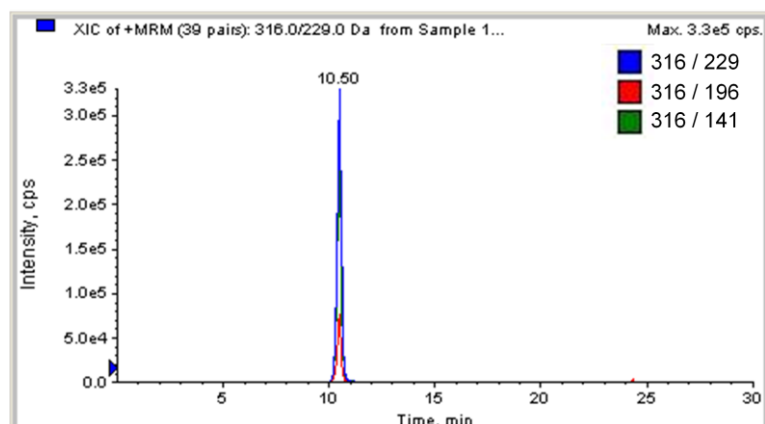
Annexe 9 : m/z 316 ; 2 hypothèses



$C_8H_9N_7SO_5$ MM 315

$[M+H]^+$ m/z 316

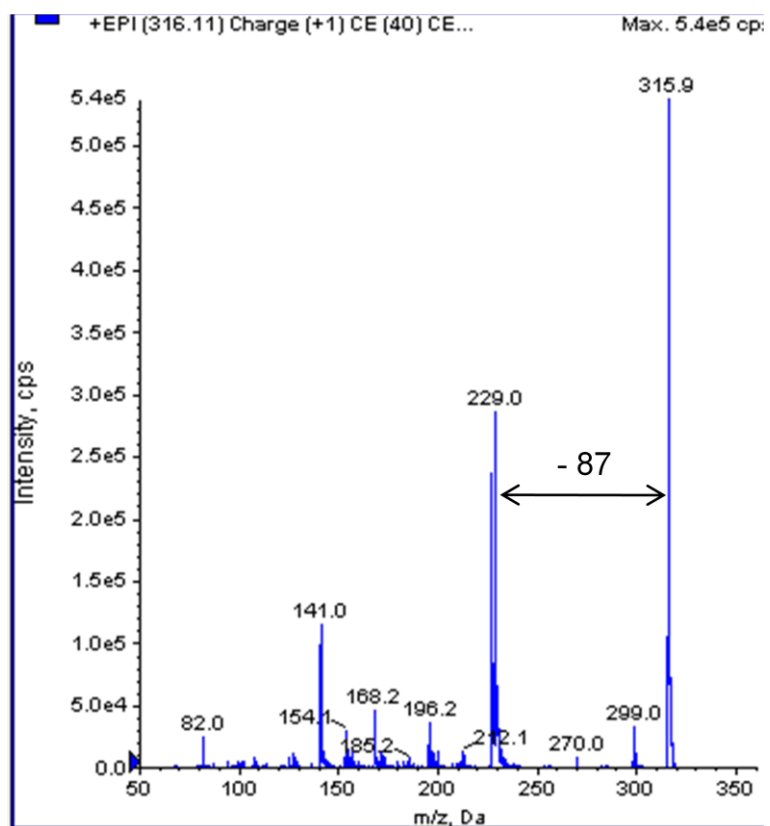
R_t 10.50



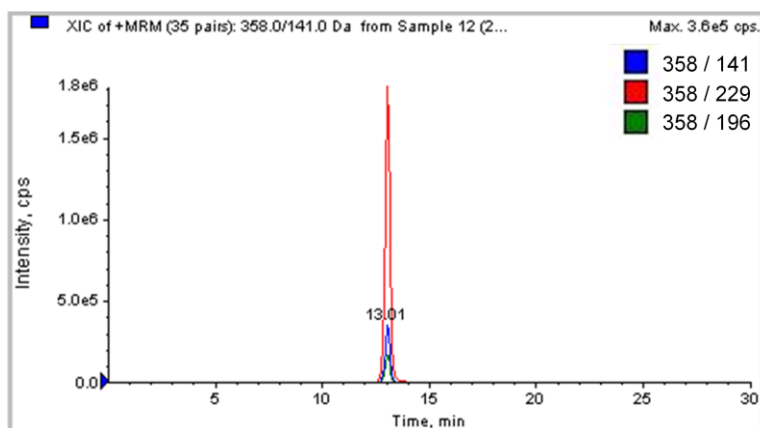
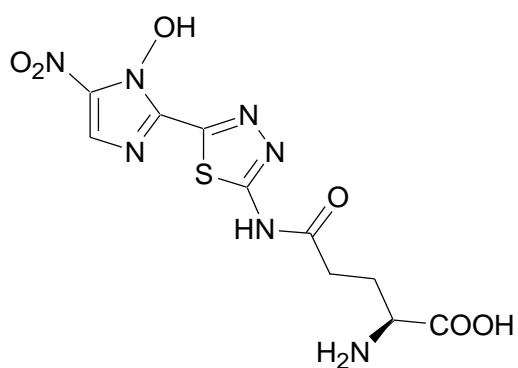
$C_8H_9N_7SO_5$ MM 315

$[M+H]^+$ m/z 316

R_t 10.50



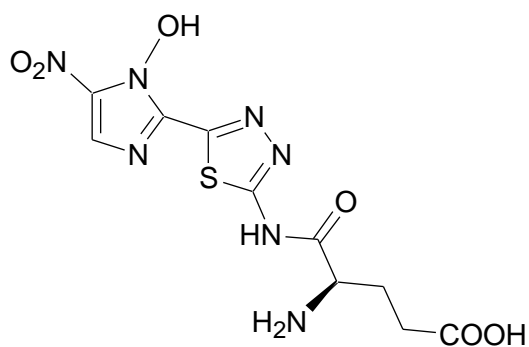
Annexe 10 : m/z 358 ; 2 hypothèses



$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_7\text{SO}_6$ MM 357

$[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 358

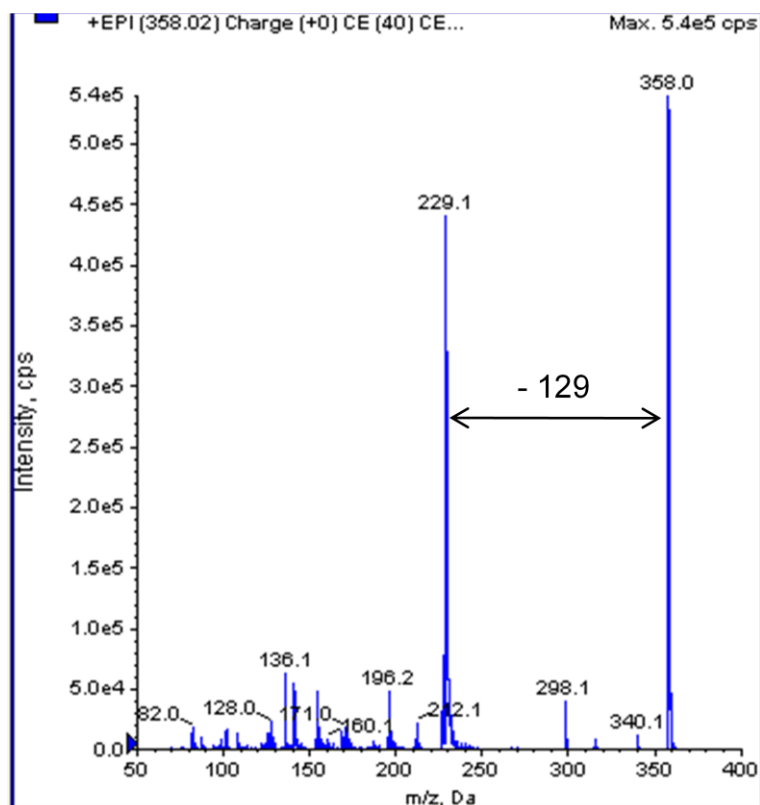
R_t 13.01



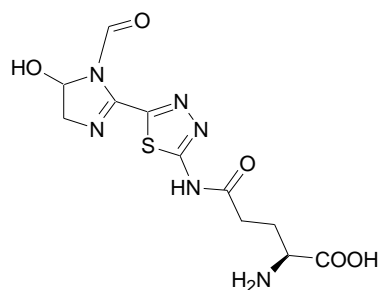
$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_7\text{SO}_6$ MM 357

$[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 358

R_t 13.01



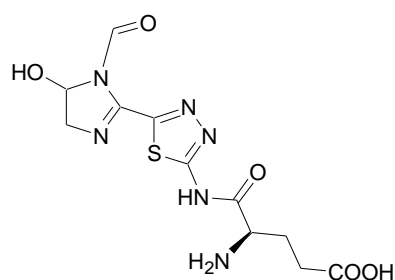
Annexe 11 : m/z 343 ; 4 hypothèses, 2 isomères



$C_{11}H_{14}N_6SO_5$ MM 342

$[M+H]^+$ m/z 343

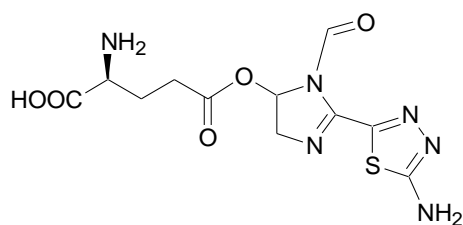
R_t 15.94 ou 18.22



$C_{11}H_{14}N_6SO_5$ MM 342

$[M+H]^+$ m/z 343

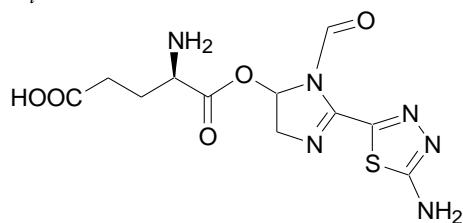
R_t 15.94 ou 18.22



$C_{11}H_{14}N_6SO_5$ MM 342

$[M+H]^+$ m/z 343

R_t 15.94 ou 18.22



$C_{11}H_{14}N_6SO_5$ MM 342

$[M+H]^+$ m/z 343

R_t 15.94 ou 18.22

Table des figures

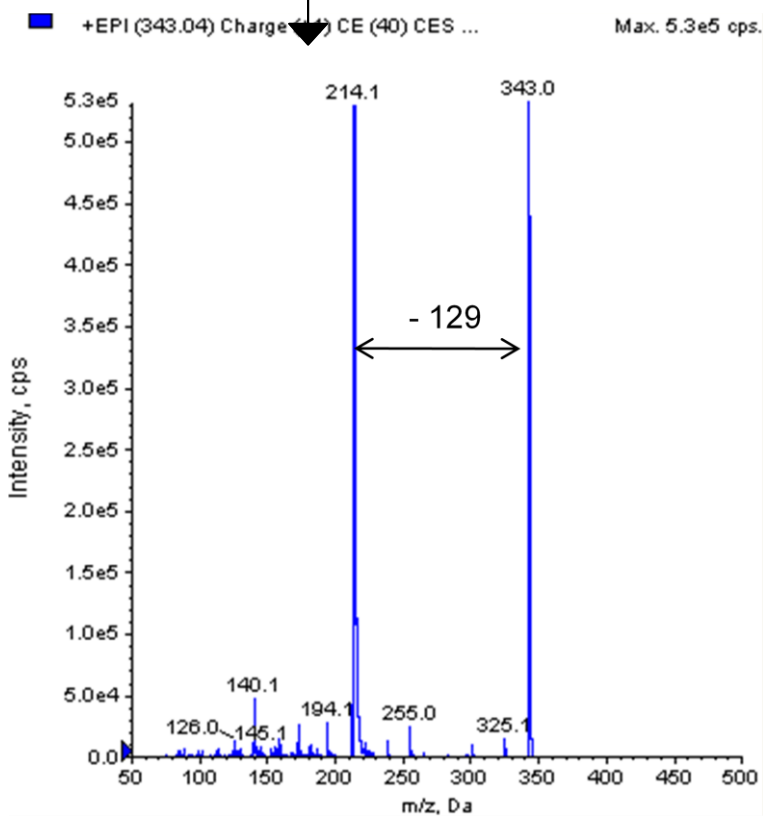
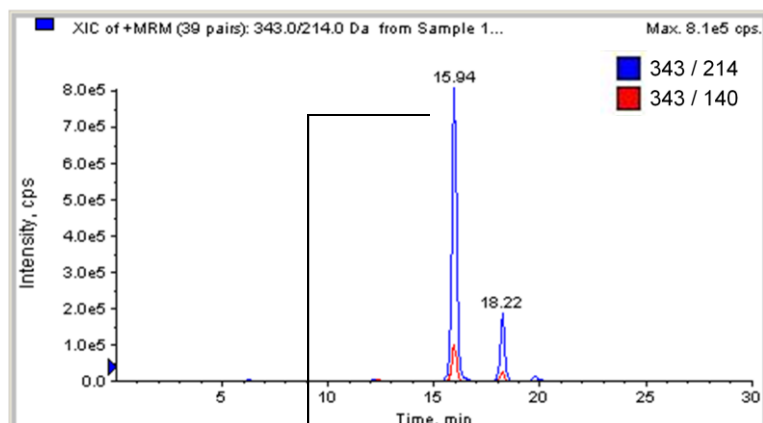


Table des figures

Figure 1 : Distribution géographique de l'incidence annuelle de la trypanosomose humaine africaine et du risque pour les voyageurs.....	7
Figure 2 : <i>T. b. gambiense</i> : comparaison dans le temps, entre les personnes placées sous surveillance active et les nouveaux cas détectés.....	8
Figure 3 : Mouche tsétsé, <i>Glossina palpalis</i>	10
Figure 4 : Probabilité de distribution géographique de <i>G. palpalis</i> , et de <i>G. morsitans</i>	10
Figure 5 : Microscopie électronique à balayage coloré de <i>T. brucei</i>	11
Figure 6 : Anatomie du trypanosome chez l'homme sous sa forme trapue courte.....	12
Figure 7 : Classification des trypanosomes.....	13
Figure 8 : Cycle de développement des trypanosomes.....	14
Figure 9 : La migration du trypanosome dans l'organisme.....	15
Figure 10 : Illustration d'un trypanome.....	16
Figure 11 : Les mécanismes immunopathologiques dans la THA.....	19
Figure 12 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA, la Pentamidine.....	23
Figure 13 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA, la Suramine.....	23
Figure 14 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA, le Mélarsoprol.....	24
Figure 15 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA, l'Eflornithine.....	24
Figure 16 : Molécule utilisée dans le traitement de la THA : le Nifurtimox.....	24
Figure 17 : Structure chimique du Diminazène et du DB75.....	26
Figure 18 : Molécules utilisant le transporteur P2.....	27
Figure 19 : Mécanisme d'action du Mélarsoprol.....	32
Figure 20 : Mécanisme d'action proposé pour l'Eflornithine.....	35
Figure 21 : Comparaison des structures chimiques du Mégazol et du Féxinidazole.....	37
Figure 22 : Structure moléculaire du Mégazol.....	42
Figure 23 : Effets du Mégazol sur la morphologie de <i>T. cruzi</i>	45
Figure 24 : Concentration plasmatique de Mégazol après ingestion de mono-doses.....	48

Figure 25 : Structure chimique du Mégazol 2D et 3D.....	51
Figure 26 : Structure moléculaire de dérivés du Mégazol.....	52
Figure 27 : Profil d'élution utilisé pour la méthode MRM.....	60
Figure 28 : Illustration du principe de l'analyse MRM.....	63
Figure 29 : Spectre MRM d'une d'un échantillon d'urine de souris traitées.....	66
Figure 30 : Exemple d'extraction de courbes pour le Métronidazole.....	66
Figure 31 : Suivi de la masse moyenne des souris par lot.....	69
Figure 32 : Suivi de la parasitémie moyenne par lot de souris.....	69
Figure 33 : Graphe de Survie comparé à la dose.....	71
Figure 34 : <i>m/z</i> 227 Mégazol.....	74
Figure 35 : <i>m/z</i> 213 Déméthyle Mégazol.....	74
Figure 36 : <i>m/z</i> 419 Hydroxy-Mégazol glucuroné sur l'amine.....	75
Figure 37 : <i>m/z</i> 419 Hydroxy Mégazol glucuroné sur l'hydroxyle.....	75
Figure 38 : <i>m/z</i> 243 hydroxy méthyle Mégazol.....	76
Figure 39 : <i>m/z</i> 243 Hydroxylamine Mégazol.....	76
Figure 40 : <i>m/z</i> 243 Sulfoxy Mégazol.....	76
Figure 41 : <i>m/z</i> 403 Mégazol glucuroné sur l'amine.....	77
Figure 42 : Proposition de structure pour l'ion <i>m/z</i> 239.....	78
Figure 43 : Proposition de structure pour l'ion <i>m/z</i> 316.....	78
Figure 44 : Proposition de structure pour l'ion <i>m/z</i> 358.....	79
Figure 45 : Proposition de structures pour les ions <i>m/z</i> 343.....	79
Figure 46 : Comparaison du rapport analyte/SI, entre urine et plasma selon les doses.....	81-82-83
Figure 47 : Spectres HPLC/MS des 2 ions retrouvés dans l'incubation par microsomes hépatiques humains.....	85
Figure 48 : Résumé des hypothèses de métabolites du Mégazol.....	87

Table des tableaux

Tableau 1 : Médicaments utilisés contre la maladie du sommeil.....	25
Tableau 2 : Principales iso-enzymes du cytochrome P450 humain	40
Tableau 3 : Protocole de traitement des souris selon les lots.....	55
Tableau 4 : Tests de solubilité du Mégazol dans différents solvants.....	58
Tableau 5 : Paramètres SM (de Spectrométrie de Masse) de chaque analyte.....	65
Tableau 6 : Résultats généraux de l'expérimentation animale.....	68
Tableau 7 : Comparaison de la durée de suivi de chaque groupe entre eux.....	72
Tableau 8 : Analytes exprimés (m/z), en fonction de leurs temps de rétention et identification.....	73
Tableau 9 : Abondance relative des métabolites m/z par extraction basique d'urines.....	80
Tableau 10 : Abondance relative des métabolites m/z par extraction alcaline d'urines.....	80

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
ABREVIATIONS	1
SOMMAIRE	5
INTRODUCTION	6
1. GENERALITES	7
1.1. ÉPIDEMIOLOGIE	7
1.2. VECTEUR DE LA MALADIE	9
1.3. LE PARASITE	11
1.4. CLINIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE LA THA	15
1.5. IMMUNOPATHOLOGIE	18
1.6. DIAGNOSTIC	21
1.7. TRAITEMENT	23
1.7.1. PRINCIPALES MOLECULES UTILISEES DANS LA THA.....	23
1.7.2. MECANISMES D'ACTION DES PRINCIPAUX MEDICAMENTS DE LA THA	26
1.8. ETUDE DES NOUVEAUX TRAITEMENTS	37
1.9. METABOLISATION DE MOLECULES THERAPEUTIQUES	38
2. LE MEGAZOL	41
2.1. MODE D'ACTION	41
2.2. ACTIVITE DU MEGAZOL	43
2.3. PHARMACOCINETIQUE	48
2.4. TOLERANCE, TOXICITE	49
2.5. MUTAGENICITE	49
2.6. RECHERCHE D'UN COMPOSE ATOXIQUE	51
3. OBJECTIFS	53
4. MATERIEL ET METHODES	54
4.1. EXPERIMENTATION ANIMALE	54
4.1.1. SOURIS	54
4.1.2. TRYPANOSOMES.....	54
4.1.3. INFECTION	54
4.1.4. PROTOCOLE THERAPEUTIQUE.....	55
4.1.5. MATERIEL THERAPEUTIQUE.....	56
4.1.6. PRELEVEMENT ET RECUEIL DE DONNEES	56
4.1.7. ANALYSES STATISTIQUES	57
4.2. RECHERCHE DE METABOLITES	57

4.2.1.	TEST DE SOLUBILITE DU MEGAZOL ET CHOIX DU SOLVANT D'EXTRACTION	57
4.2.2.	INCUBATION DU MEGAZOL PAR DES MICROSOMES HEPATIQUES HUMAINS	59
4.2.3.	EXTRACTIONS.....	59
4.2.4.	ANALYSES HPLC/MS.....	60
5.	RESULTATS	67
5.1.	EXPERIMENTATION ANIMALE.....	67
5.1.1.	RESULTATS GENERAUX.....	67
5.1.2.	RESULTATS STATISTIQUES	70
5.2.	RECHERCHE DE METABOLITES.....	73
5.2.1.	METHODE GUS	73
5.2.2.	METHODE MRM.....	80
5.2.3.	INCUBATION DE MICROSOMES HEPATIQUES HUMAINE	84
6.	DISCUSSION	88
6.1.	EXPERIMENTATION ANIMALE.....	88
6.2.	RECHERCHE DE METABOLITES	93
	BIBLIOGRAPHIE.....	98
	ANNEXES	116
	TABLE DES FIGURES	128
	TABLE DES TABLEAUX.....	130
	TABLE DES MATIERES	131
	SERMENT DE GALIEN	134

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Activité trypanocide du Mégazol sur le modèle murin à *Trypanosoma brucei brucei* : recherche d'une dose efficace et identification des métabolites

RESUMÉ : La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) où maladie du sommeil, est un fléau cantonné aux zones retirées du continent africain ou sévit la mouche tsétsé (ou glossine). Cette maladie tropicale négligée reste difficilement maitrisable de part la complexité de mise en œuvre de ses traitements et leurs fortes toxicités, ce qui implique un besoin de nouvelles molécules efficaces.

Les recherches sur le Mégazol, dont l'activité anti-trypanosome a déjà été démontrée depuis un demi-siècle, ont été stoppées depuis la re-découverte de sa mutagénicité. L'utilisation de ce 5-nitroimidazolé a toujours été étudiée à des doses assez élevées (80 à 100 mg/kg). Nous avons décidé de tester des doses inférieures de Mégazol sur des souris, dans l'espoir de diminuer sa mutagénicité et ainsi fournir un nouvel outil thérapeutique pour la lutte contre les parasitoses dues aux trypanosomes. C'est pourquoi nous avons mis en place un protocole pour définir la dose minimum efficace du Mégazol qui se situerait entre 20 et 60 (mg/kg).

La seconde partie de ces travaux concerne l'étude des métabolites du Mégazol. Leurs détections ont été effectuées par chromatographie liquide haute performance couplé à la spectrométrie de masse, dans des échantillons d'urine et de plasma de souris traitées, et dans une incubation de microsomes hépatiques humaine de Mégazol. Dans les urines, treize métabolites ont été détectés (masse molaire M= 212 ; 238 ; 242x3 ; 315 ; 342x2 ; 357 ; 402x2 ; 418x2). Dans le plasma, seuls 3 métabolites ont été détectés (M= 212 ; 238 ; et 342 élué à 15,0 minutes). Enfin dans l'incubation par des microsomes hépatiques seuls les métabolites de M= 212 et 242 ont été retrouvés. Les résultats obtenus à partir du plasma de souris et de l'incubation de microsomes hépatiques sont plus discutables, car la détection des métabolites n'est pas optimisée pour ces milieux faiblement concentrés en métabolites. L'étude des schémas habituels de métabolisation a permis de préciser des hypothèses structurales simples pour certains de ces métabolites. Pour d'autre, les hypothèses émises correspondent à des métabolisations plus complexes nécessitant plusieurs étapes et restent donc à étudier.

Au final, la caractérisation de ces métabolites reste à confirmer, et pour chacun d'entre eux l'activité anti-trypanosome et la mutagénicité reste à étudier.

MOTS CLÉS : Trypanosomose humaine Africaine, maladie du sommeil, traitement, 5-nitroimidazolé, Mégazol, CL 64 855, Chromatographie liquide haute performance, Spectrométrie de masse, HPLC/MS.

Trypanocidal activity of Megazol on the murine model of *Trypanosoma brucei brucei* : determination of an effective dose and metabolite identification

ABSTRACT: Human African Trypanosomiasis (THA) or sleeping sickness is an affliction confined to remote African areas, transmitted by the the tsetse fly bite (*Glossina* sp.). This neglected tropical disease remains difficult to control due to the toxicity and complexity of implementing actual treatments, which implies a need for new effective molecules.

Research on Megazol, whose anti-trypanosome activity has already been demonstrated for over a half century, has been stopped since rediscovering its mutagenicity. The use of this 5-nitroimidazole has always been studied at high doses (80 to 100 mg/kg). We decided to test lower doses of Megazol on mice, hoping to reduce its mutagenicity and thus provide a new therapeutic tool in the fight against parasitic diseases caused by trypanosomes. For this reason, we implemented a protocol to define the minimum effective dose of megazol which is situated between 20 and 60 (mg / kg).

The second part of this study concerns Megazol metabolites. Metabolites were detected by high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry in urine and plasma samples from treated mice, and also in human liver Megazol incubation. In urine, thirteen metabolites were detected (molar mass M = 212; 238, 242x3, 315, 342x2, 357, 402x2, 418x2). In plasma, only three metabolites were detected (M = 212, 238, and the 342 eluted at 15.0 minutes). Finally, in hepatic incubation only M = 212 and 242 metabolites were found. Results obtained from mice plasma and human liver incubation, are more uncertain, because metabolite detection was not optimized for these two environments due to their low metabolite concentration. The study of habitual metabolism patterns defined a simple structural hypothesis for some of these metabolites. Others correspond to a more complex metabolism requiring several steps and remained to be examined.

Finally, characterization of these metabolites must be confirmed, and for each, anti-trypanosome activity and mutagenicity remains to be studied.

KEY WORDS : Human african trypanosomiasis, Sleeping sickness, treatment, 5-nitroimidazole, Megazol, CL 64 855; High performance liquid chromatography, Mass spectrometry, HPLC/MS.

Discipline: Pharmacie, Parasitologie

Adresse: UMR Inserm 1094
Faculté de pharmacie
2, rue du Docteur Marland
87025 LIMOGES