

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE: 2015

THESE 2015 / TOU3 / 2054

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

BOUDOT Clotilde

**ACTIVITE TRYPANOCIDE DU MEGAZOL SUR DEUX MODELES
HUMAINS ET MURINS ET IDENTIFICATION DE SES METABOLITES**

Le 19 juin 2015

Directeur de thèse : COURTIOUX Bertrand

JURY

VALENTIN, Alexis
COURTIOUX, Bertrand
GANDIA-MAILLY, Peggy
MORVAN, Bernard

Président
1^{er} assesseur
2^{ème} assesseur
3^{ème} assesseur

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2014

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAUMONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
Mme SAUTEREAU A-M	Pharmacie galénique
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P	Pharmacie Clinique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie
Mme THOMAS F	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C	Biophysique
M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C	Physiologie
Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
Mme COSTE A (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N	Biochimie
Mme DERAËVE C	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F	Toxicologie
Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
Mme LEFEVRE L	Physiologie
Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
M. LEMARIE A	Biochimie
M. MARTI G	Pharmacognosie
Mme MIREY G (*)	Toxicologie
Mme MONTFERRAN S	Biochimie
M. OLICHON A	Biochimie
M. PERE D	Pharmacognosie
Mme PHILIBERT C	Toxicologie
Mme PORTHE G	Immunologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D	Hématologie
Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C (**)	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
M. PÉRES M. (**)	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

Mme PALOQUE L	Parasitologie
Mme GIRARDI C	Pharmacognosie
M IBRAHIM H	Chimie anal. - galénique

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2014

Remerciements

A Mr le Professeur Alexis Valentin

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider mon jury de thèse, pour votre implication tout au long de ces six années dans mon projet, pour votre gentillesse et vos conseils toujours très précieux. Vous avoir eu comme professeur a été un réel plaisir.

A Mr le Docteur Bertrand Courtioux

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de m'encadrer pour ce travail, pour votre gentillesse constante, et votre patience. Merci de m'avoir transmis vos connaissances sur un sujet aussi passionnant que la Trypanosomose.

A Mme le Docteur Peggy Gandia-Mailly

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de faire partie de mon jury de thèse. J'espère avoir su mettre en avant vos cours de pharmacocinétique au cours de ce mémoire.

A Mr le Docteur Bernard Morvan

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de participer à mon jury de thèse. Merci de nous avoir fourni cette molécule, le Mégazol, qui nous l'espérons à un bel avenir comme médicament.

Je remercie le Pr Pierre-Marie Preux, directeur de l'UMR INSERM 1094 NET, et le Pr Marie-Laure Dardé, responsable de l'axe Neuroparasitoses de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de parasitologie.

Je remercie le Dr Nicolas Picard, pour sa disponibilité, son attention pour mon travail et son aide précieuse.

Je remercie le Dr Bernadin Akagah, de la société Alpha Chimica, d'avoir participé à mon projet avec toutes les difficultés qu'il comportait, et de m'avoir reçue avec une grande amabilité pour répondre à mes interrogations.

Je remercie chaleureusement Melle Emilie Pinault, pour ton entière implication dans mon travail, ta gentillesse, ta compréhension et ton temps passé devant le spectro et les évaporations qui n'en finissent pas. Ce fut très agréable d'apprendre avec toi.

Je remercie Mr Jean-Hervé Comte, pour votre temps consacré à l'étude des microsomes, pour votre bienveillance, et votre savoir-faire. Merci à Bastien, pour ton aide et tes dilutions que tu adores faire ☺.

Un remerciement tout particulier à Julien Bonnet, qui m'a plus qu'aidé dans ce travail. Merci pour le temps que tu as pris à participer à l'étude des souris, des trypano (conta/pas conta...on verra bien). Et tu sais tu finiras par être docteur toi aussi, un jour ☺.

Je remercie l'ensemble de l'équipe UMR 1094, Mr le Docteur Aurélien Mercier pour vos conseils, Emilie, Paula, Patcharee, Karim, Audrey, Khadija, Martine, Roselyne, Charlotte, Elisabeth, pour votre bonne humeur et votre soutien.

Je remercie aussi, l'équipe UMR 1092, avec Gaëtan, Manon, Florence, Mélissa et tous les autres, pour des pauses déjeuners toujours réconfortantes. « Nous sommes des arbres, le vent passe entre nos feuilles »☺.

Je remercie Sylvie, et l'ensemble du personnel de l'animalerie pour leur aide, et leur gentillesse à mon égard.

A mes souris, qui ont largement contribué à ce travail. Merci !

Un tendre remerciement à ma bibi Alexandra, ces six années de pharmacie avec toi ont été fantastiques. Cette fac va nous manquer, mais les souvenirs y sont à jamais gravés.

A tous mes amis Claire, Sophie, Caroline, Anaé, Romain et tous les autres tout aussi importants, merci de m'avoir supportée depuis tout ce temps, ce n'était pas facile tous les jours ☺ mais vous avez toujours été là.

A ma famille que j'aime, merci d'avoir fait de moi ce que je suis. Ce travail est aussi un peu le vôtre, alors chapeau !

Merci à Alexandre, d'être toujours à mes côtés, et de m'encourager dans tous mes choix risqués ou pas.

A ma mère, qui est la personne la plus exceptionnelle que je connaisse. Ton courage est un exemple pour moi. Merci pour tout.

À ma mère,

Sommaire

INTRODUCTION	1
I. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1. EPIDEMIOLOGIE	2
2. VECTEUR DE LA MALADIE	4
3. PARASITE.....	5
4. CYCLE PARASITAIRE	6
5. CLINIQUE DE LA THA	7
5.1. <i>Stade 1, hémolympathique</i>	7
5.2. <i>Stade 2, hémato-encéphalique</i>	7
6. IMMUNOPATHOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE	8
6.1. <i>Stade 1, hémolympathique</i>	8
6.2. <i>Passage de la barrière hémato-encéphalique</i>	10
6.3. <i>Stade 2, hémato-encéphalique</i>	11
7. DIAGNOSTIC.....	12
8. METABOLISATION DE MOLECULES THERAPEUTIQUES	14
9. TRAITEMENTS	15
9.1. <i>Traitements actuels</i>	15
9.2. <i>Mécanisme d'action de ces molécules</i>	17
9.3. <i>Etude des nouveaux traitements</i>	26
9.4. <i>Mégazol</i>	27
9.4.1. <i>Activité biologique</i>	27
9.4.2. <i>Mode d'action</i>	30
9.4.3. <i>Pharmacocinétique</i>	32
9.4.4. <i>Tolérance et Toxicité</i>	33
9.4.5. <i>Mutagénicité</i>	33
9.4.6. <i>A la recherche d'un composé atoxique</i>	34
10. OBJECTIFS	35
II. ETUDE EXPERIMENTALE.....	36
1. MATERIELS ET METHODES	36
<i>Matériels et souches utilisés</i>	36
1.1. <i>Expérimentation in vivo</i>	36
1.1.1. <i>Matériels</i>	36
1.1.2. <i>Méthodes</i>	38
1.2. <i>Expérimentation ex vivo</i>	43
1.2.1. <i>Matériel</i>	43
1.2.2. <i>Méthodes</i>	44
1.3. <i>Identification et synthèse des métabolites</i>	44
2. RESULTATS	46
2.1. <i>Expérimentation in vivo</i>	46
2.2. <i>Expérimentation ex vivo</i>	52
3. DISCUSSIONS	54
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	61
BIBLIOGRAPHIE	62
SITE WEB:	78
ANNEXES.....	79

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AdoMetDC	S-adénosyl-L-méthionine décarboxylase
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CATT	Card Agglutination Test for Trypanosomiasis
CMC	Carboxyméthylcellulose
CTC	Centrifugation en tube capillaire
CXCL10	CXC motif chémokine ligand 10
CYP450	Cytochrome P450
DL50	Dose létale 50
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
FIND	Foundation for innovative new diagnosis
GUS	General Unknown Screening
HAPT1	High affinity pentamidine transporter 1
HBMECs	Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines
HCl	Acide Chlorhydrique
HPLC/MS	High Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry
IFNγ	Interféron γ
IL10	Interleukine 10

IM	Intramusculaire
iNOS	inductible Nitric Oxyde Synthase
IP	Intrapéritonéale
IV	Intraveineuse
LAPT1	Low affinity pentamidine transporter 1
LCR	Liquide Céphalo-rachidien
LPS	Lipopolysaccharide
LTh1	Lymphocyte T helper 1
mAECT	mini Anion Exchange Centrifugation Technique
MMP2	MatrixMétalloProtéase 2
MPXR	Melarsoprol-Pentamidine cross resistance
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MTS	Multi-Target-Screening
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Dihyronicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
NECT	Nifurtimox-Eflornithine combinaison therapy
NFκB	Nuclear factor κ B
NO	Oxyde Nitrique (monoxyde d'azote)
NTR1	Nitroréductase de type 1
ODC	Ornithine décarboxylase

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PFK1	Phosphofructokinase 1
PFK2	Phosphofructokinase 2
PGE2	Prostaglandine E2
PO	<i>Per os</i>
QBC	Quantitative Buffy Coat technique
SNC	Système nerveux central
SOCS	Suppressors of cytokines signaling
SOD	Super oxyde dismutase
T.b.	<i>Trypanosoma brucei</i>
TbAQP2	<i>T.brucei</i> aquaglyceroporin 2
THA	Trypanosomose Humaine Africaine
TLR9	Toll Like Receptor 9
TLTF	Trypanosome Lymphocyte-Triggering Factor
TNFα	Tumor necrosis factor α
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VSG	Variable Surface Glycoprotein

Liste des figures

Figure 1. Nombre de nouveaux cas de THA en 2013	p 2
Figure 2. Nombre de nouveaux cas de THA entre 1940-2013	p 3
Figure 3. <i>Glossina morsitans</i>	p 4
Figure 4. Cycle parasitaire de la THA	p 6
Figure 5. Les mécanismes immunopathologiques dans la THA	p 9
Figure 6. Principaux mécanismes impliqués dans l'inflammation encéphalique de la THA	p 11
Figure 7. Structure de la Pentamidine	p 17
Figure 8. Structure de la Suramine	p 19
Figure 9. Structure du Mélarsoprol	p 20
Figure 10. Structure de l'Eflornithine	p 23
Figure 11. Structure du Nifurtimox	p 25
Figure 12. Structure du Fexinidazole	p 26
Figure 13. Structure du Mégazol	p 27
Figure 14. Structure similaire entre le Mégazol, l'oxyde de Mélarsen et les aminopurines	p 31
Figure 15. Synthèse du Mégazol	p 36
Figure 16. Illustration du principe de MRM	p 43
Figure 17. Technologie utilisée par alpha Chimica	p 45
Figure 18. Suivi de la parasitémie moyenne par lot de souris pour l'étude 1	p 47
Figure 19. Suivi de la parasitémie moyenne par lot de souris pour l'étude 2	p 47
Figure 20. Suivi de la masse moyenne par lot de souris pour l'étude 1	p 47
Figure 21. Suivi de la masse moyenne par lot de souris pour l'étude 2	p 48
Figure 22. Comparaison du rapport analyte/SI, entre urine et sérum en fonction des lots	p 50
Figure 23. Métabolisme du Mégazol par des microsomes hépatiques humains	p 51

Liste des tableaux

Tableau 1. Médicaments utilisés dans la THA	p 16
Tableau 2. Protocole de traitement des souris par groupes (étude 1)	p 38
Tableau 3. Protocole de traitement des souris par groupes (étude 2)	p 39
Tableau 4. Plan de manipulation avec les microsomes	p 44
Tableau 5. Résultats généraux des deux études	p 46

Liste des annexes

Annexe 1 : Synthèse récapitulative des spectres MS/MS de tous les ions détectés p 78

Annexe 2 : Comparaison des rapports analyte/SI entre urine et sérum pour chaque lots aux différents prélèvements pour G1 à G6 p 87

Annexe 3 : Comparaison des rapports analyte/SI entre urine et sérum pour chaque lots aux différents prélèvements pour GA à GE p 91

Annexe 4 : Revue : **Human African trypanosomiasis: For a simplified diagnosis** p 96

Annexe 5: Article: **Characterization of the metabolites of the anti-trypanosomal megalin in mice and human liver microsomes using tandem mass spectrometry**. Short running title: Megalin's metabolites characterization in mouse fluids p 97

Introduction

La Trypanosomose humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil est une parasitose vectorielle endémique retrouvée dans 36 pays d'Afrique sub-saharienne allant de la Guinée à l'Ethiopie en longitude et du Mali à la Namibie en latitude.

Cette maladie est due à un protozoaire flagellé extracellulaire du genre *Trypanosoma* et d'espèce *brucei* transmis par son vecteur, la mouche tsétsé genre *Glossina*. Lors du repas sanguin de cette dernière, elle inocule le parasite qui après un temps court au niveau du derme, passe au niveau de la circulation et s'y multiplie. Ce stade appelé stade 1 hémo-lymphatique se traduit par des signes cliniques de type adénopathies, céphalées. Par la suite, le parasite est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour se retrouver au niveau du système nerveux central (SNC) et plus précisément dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et ainsi signer l'entrée en stade 2 de la maladie. Les symptômes caractéristiques de ce stade sont une perturbation du cycle veille-sommeil et des atteintes nerveuses et psychiatriques. Le majeur problème de cette maladie est qu'en absence de traitement, l'évolution est mortelle.

Le dépistage de cette pathologie, sa prise en charge ainsi que les méthodes de lutte vectorielle sont donc primordiaux pour permettre aux populations de lutter efficacement contre cette maladie. Le dépistage de la maladie et le diagnostic de stade vont ainsi orienter la prise en charge et le traitement approprié.

Malheureusement, à l'heure actuelle les médicaments sont « stades dépendants » et présentent de nombreuses limites. Outre le fait, d'être anciens, certains d'entre eux présentent des effets indésirables graves tels que des encéphalopathies arsenicales retrouvées avec le Méarsoprol ou des effets secondaires d'anticancéreux pour l'Eflornithine. De plus, l'apparition de résistances, la difficulté d'emploi et le coût de ces médicaments démontrent à quel point il est impossible de s'arrêter là et que la recherche de nouveaux traitements doit être au cœur des préoccupations.

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail de recherche sur le Mégazol. L'objectif principal est d'étudier l'effet trypanocide du Mégazol sur un modèle murin, puis secondairement de déterminer la dose minimale efficace, d'étudier la stabilité métabolique du Mégazol par des microsomes hépatiques humains et murins tout en identifiant ses métabolites.

I. Contexte bibliographique

1. Epidémiologie

Pendant longtemps qualifiée de maladie tropicale négligée, la Trypanosomose humaine Africaine a vu sa prévalence largement varier au cours des années avec la mise en place de nombreux contrôles et programmes d'intervention. Cependant, environ 70 millions de personnes, vivant dans des zones principalement rurales ou reculées d'Afrique sub-saharienne appelées « fin de piste », présentent un risque élevé d'infection à THA. Parmi eux, 57 millions sont à risque de contracter une THA à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b.gambiense*) et 12,3 millions à *T.b.rhodesiense* (Franco *et al.*, 2014). On distingue deux types de trypanosomose, la première responsable de la majorité des cas est due à *T.b.gambiense*, retrouvé dans 24 pays d'Afrique de l'Ouest et Centrale et qui entraîne une forme chronique de la maladie. La deuxième due à *T.b.rhodesiense*, est une forme beaucoup plus aiguë de la maladie concentrée sur 13 pays d'Afrique de l'Est et du Sud. Toutefois, il est à noter que cette dernière forme tend à s'étendre vers l'Ouest et notamment en Ouganda, pays où les deux formes sévissent (Simarro *et al.*, 2011) (Figure 1).

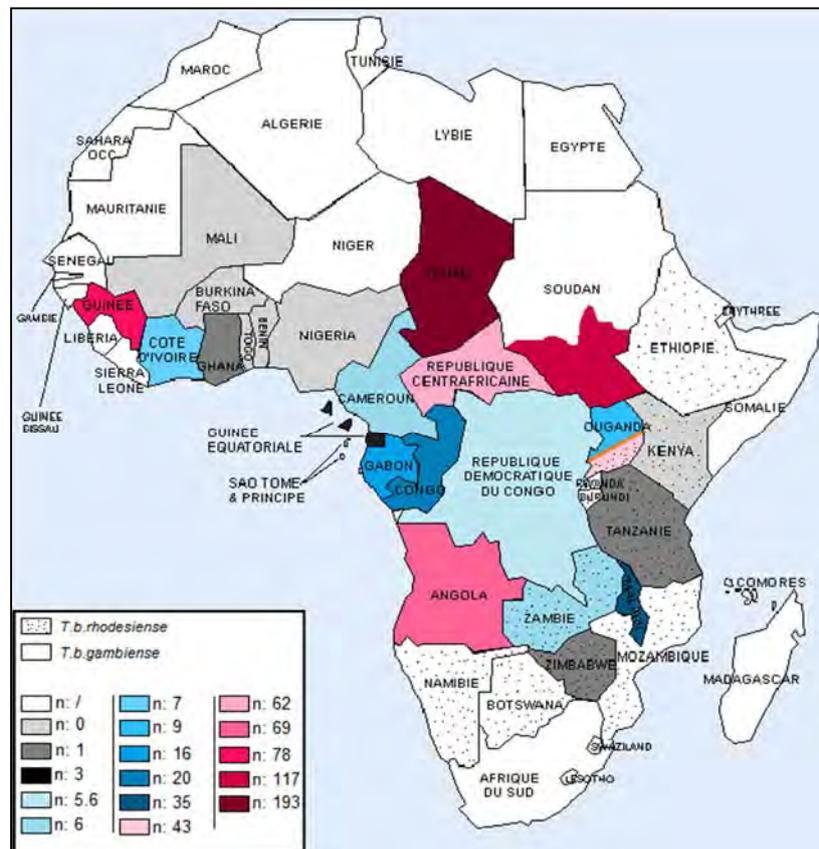


Figure 1. Nombre de nouveaux cas de THA en 2013 (données recueillies par l'OMS) (Franco *et al.*, 2014 ; Bonnet *et al.*, 2015)

Le continent africain a subi trois grandes épidémies ravageant les populations. La première, à la fin du XIX^{ème} siècle, lors de la colonisation européenne et du trafic d'humains (Brun *et al.*, 2010); la deuxième a eu lieu dans les années 1920 jusqu'à la fin des années 1940, suite aux guerres mondiales empêchant la prise en charge des populations et l'accès au soin. Par la suite, les puissances coloniales ont alors investi plus fermement dans la lutte vectorielle et la prise en charge des populations permettant une éradication presque définitive de la maladie. Malheureusement, l'indépendance des pays africains, et l'émergence des conflits essentiellement dus aux problèmes sociaux, économiques et politiques des pays, a provoqué la réapparition de la maladie dans les années 70 avec un pic important dans les années 90 en République Démocratique du Congo, en Angola, en République Centrafricaine ou encore dans le sud du Soudan et de l'Ouganda (Smith *et al.*, 1998).

Toutefois, depuis le début du XXI^{ème} siècle, le nombre de nouveaux cas de THA tend à diminuer de par une meilleure prise en charge des populations (accès au dépistage, aux soins, à l'élaboration de pièges) mais aussi par la fin de certains conflits et l'engagement des gouvernements à lutter contre cette maladie considérée comme un grand problème de Santé Publique (Figure2).

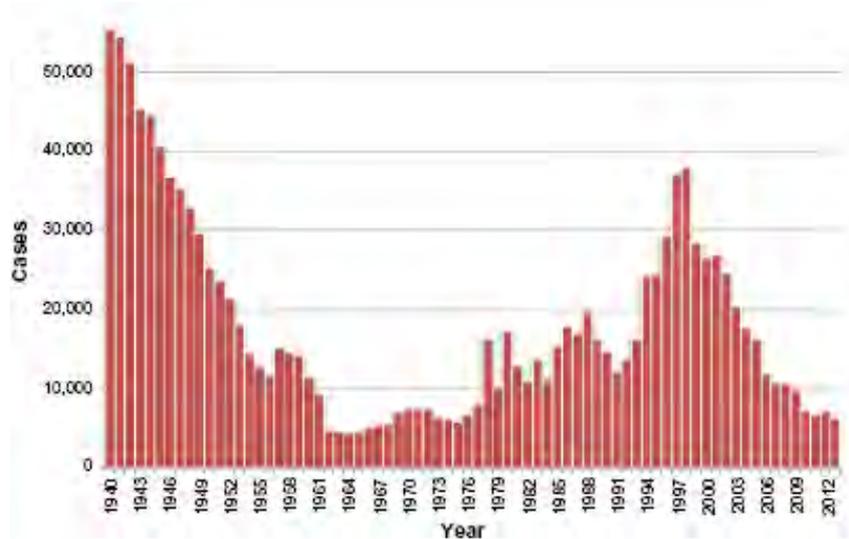


Figure 2. Nombre de nouveaux cas de THA entre 1940-2013 (données recueillies par l'OMS)
(Franco *et al.*, 2014)

Il ne faut cependant pas perdre de vue que cette maladie est encore loin d'être éradiquée du continent africain, et que la prise de conscience de la maladie au sein de la communauté internationale a encore un long chemin à parcourir.

2. Vecteur de la maladie

La Glossine également appelée mouche tsétsé signifiant « qui tue le bétail », est une mouche brune piqueuse hématophage de 6 à 16 mm de long appartenant à l'ordre des Diptères et au genre *Glossina*. (Figure 3) Elle présente une trompe horizontale en prolongement du corps et ses ailes sont croisées sur le dos au repos (Gentilini *et al.*, 1986). Elle est telmophile et vivipare. Le mâle et la femelle piquent et sont capables de transmettre la maladie lors de leur repas sanguin (Brun *et al.*, 2010).



Figure 3. *Glossina morsitans*
(www.raywilsonbirdphotography.co)

Il existe différentes espèces de Glossine, les principales sont *Glossina palpalis*, vivant aux abords des points d'eau et responsable de la transmission de *T.b.gambiense* ; *G.morsitans* vivant plutôt en savane sèche et transmettant *T.b.rhodesiense* (Gentilini *et al.*, 1986). Mais on peut également retrouver *G. tachinoïdes* vivant dans les forêts et responsable de la transmission de *T.b.gambiense*.

Insecte nocturne, elle pique de préférence tôt le matin ou tard le soir les animaux et/ou l'Homme passant à sa portée, et se réfugie dans des sites ombragés durant la journée (Rogers, 1985). Elle a besoin de conditions particulières pour survivre comme une température de 16 à 38 °C et un taux d'humidité relative de 50 à 80 % (Franco *et al.*, 2014). Elle est qualifiée de « mauvais vecteur » de part une perte de parasites lors de son repas sanguin (Gentilini *et al.*, 1986).

Cette mouche ne se contamine qu'une fois au cours de son premier repas sanguin en piquant un trypanosomé ou animal parasité. Elle ingère alors des trypanosomes, qui vont alors subir un cycle complexe.

3. Parasite

Les trypanosomes sont des protozoaires sanguicoles flagellés de la famille des *Trypanosomatidae*.

Il existe deux grands groupes capables de parasiter de nombreux vertébrés, poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères :

- Les **Stercoraria**, transmis par déjections de leur vecteur. Par exemple, *T.cruzi*, retrouvé dans la maladie de Chagas transmis par une punaise. Cette trypanosomose amérindienne comprend des formes extracellulaires et intracellulaires (Stevens *et al.*, 2004).
- Les **Salivaria**, transmis par piqûre, soit par passage dans les glandes salivaires du vecteur, soit directement par les organes piqueurs de l'insecte. On retrouve *T.brucei*, parasite extracellulaire d'hôte vertébré, regroupant différentes sous-espèces (Stevens *et al.*, 2004).
 - *T.b.brucei*, non pathogène chez l'Homme par la présence d'une molécule d'haptoglobuline capable de lyser le parasite, il est responsable chez les animaux (bétail, carnivores) du Nagana. Il s'agit de la forme la plus utilisée dans la recherche expérimentale (Poltera *et al.*, 1985).
 - *T.b.rhodesiense*, agent d'une anthroponose, il est essentiellement localisé en Afrique de l'Est et du Sud et provoque une forme aigüe de la maladie chez l'Homme (Welburn *et al.*, 2001).
 - *T.b.gambiense*, considéré comme anthroponotique, cette forme se concentre principalement en Afrique Centrale et de l'Ouest, et est responsable de la forme chronique de la maladie. L'animal contaminé ne jouant que le rôle de réservoir (Sternberg *et al.*, 2014).

Ces trois sous-espèces présentent les mêmes caractéristiques d'un point de vue morphologique et ne diffèrent que selon le stade du cycle de développement dans lequel elles se trouvent.

Ces parasites possèdent une anatomie relativement simple composé d'un noyau contenant le matériel génétique, un kinétoplaste à l'extrémité postérieure de la cellule, et des antigènes de « couvertures » composés de glycoprotéines VSG (Variant Surface Glycoprotéin) qui participent à l'échappement du parasite vis-à-vis de la réponse immunitaire de l'hôte (Vikermann *et al.*, 1988; Barry, 1997). De plus, ces parasites ont la capacité de changer leur manteau glycoprotéique plus d'une centaine de fois chez l'hôte afin de survivre.

4. Cycle parasitaire

Ce cycle est complexe et présente différents stades biologiques du parasite à la fois chez le vecteur et chez l'hôte (Franco *et al.*, 2014; Bonnet *et al.*, 2015) (Figure 4).

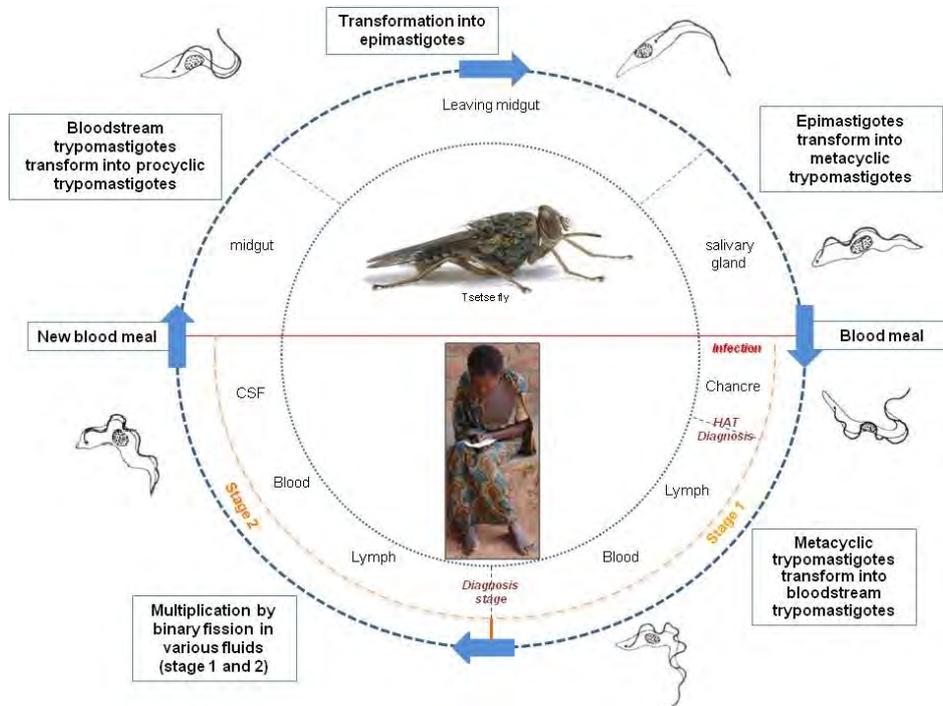


Figure 4. Cycle parasitaire de la THA
(Bonnet *et al.*, 2015)

- ❖ Lors d'un repas sanguin d'une mouche infectée, cette dernière en piquant, forme un trou capillaire où elle injecte sa salive afin d'éviter la coagulation sanguine. C'est à cet instant que les parasites sont transmis à l'hôte. Ils sont alors stockés durant 4 à 5 jours dans un chancre sous forme métacycliques. Ils vont s'y multiplier et s'y transformer en trypomastigotes circulants afin de rejoindre la circulation sanguine et lymphatique représentant le stade 1 de l'infection. Une fois dans ces différents fluides, ils vont y séjourner et s'y multiplier par fission binaire. Certains vont pouvoir franchir la BHE et se retrouver au niveau du LCR. Cette atteinte marque le début du stade 2 de la maladie (Vickermann *et al.*, 1988).
- ❖ L'hôte, ainsi parasité, constitue un réservoir pour d'autres glossines. Une nouvelle mouche non parasitée venant se nourrir sur cet hôte va alors ingérer des trypomastigotes circulants qui se trouvant dans l'intestin de la mouche vont se transformer en trypomastigotes procycliques (indemne de manteau glycoprotéique). Ces derniers vont quitter l'intestin, se transformer en épimastigotes et vont aller se loger dans les glandes salivaires du vecteur,

où ils vont subir une dernière transformation en trypomastigotes métacycliques attendant une prochaine infestation (Oberle *et al.*, 2010; Rotureau *et al.*, 2013).

5. Clinique de la THA

Les signes cliniques de la maladie sont liés au développement de la réponse immunitaire de l'hôte mettant en jeu différents acteurs en fonction de la progression de la maladie. Il faut savoir également que l'évolution du stade hémolympathique vers le stade nerveux de la maladie varie en fonction de la sous-espèce. Pour *T.b.gambiense*, l'évolution est de plus d'un an, alors que pour *T.b.rhodesiense*, elle peut être de 3 semaines (Pépin *et al.*, 2001). Les symptômes sont généralement les mêmes pour les deux formes.

5.1. Stade 1, hémolympathique

Ce stade commence à la suite de la piqûre au niveau du chancre d'inoculation. Ce chancre n'est pas toujours présent suivant la sous-espèce mis en cause. Les signes sont non-spécifiques et variables suivant les individus et peuvent apparaître en une à trois semaines. On retrouve une fièvre intermittente, des céphalées, un prurit, mais également des adénopathies (servant au diagnostic lors de la palpation), une possible asthénie, une anémie, voire une hépatosplénomégalie (Duggan *et al.*, 1966 ; Brun *et al.*, 2010).

La fièvre intermittente est due à une réaction inflammatoire de type 1 associée à l'activation des cellules macrophagiques 1, à de hautes concentrations d'IFN- γ , de TNF- α , de radicaux libres tel le NO et leurs métabolites. Néanmoins, une réponse immunitaire exagérée peut entraîner des dommages tissulaires. Pour éviter cela, une réaction immunitaire de type 2 peut se mettre en place, en faisant intervenir des cellules macrophagiques 2 induisant 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 (Stijlemans *et al.*, 2007).

5.2. Stade 2, hémato-encéphalique

Lors du passage du parasite dans le LCR, les symptômes retrouvés sont essentiellement d'ordre neurologique comme des tremblements, des paresthésies, des troubles de l'équilibre et d'ordre psychiatrique comme une irritabilité, une agressivité et des psychoses plus ou moins importantes (Blum *et al.*, 2001). Le signe le plus marquant, et qui a donné son nom à la maladie, est une perturbation du cycle veille-sommeil (Buguet *et al.*, 2001). En effet, il a été démontré que la maladie était responsable d'une dérégulation du rythme circadien, ainsi que d'une

fragmentation du sommeil accompagnée d'une disparition de la sécrétion circadienne de prolactine, de rénine, d'hormones de croissance et de cortisol. Seul le cycle de la mélatonine est encore conservé (Lundkvist *et al.*, 2004). De plus, la fréquence et l'intrication de ces signes augmentent avec la durée de la maladie (Blum *et al.*, 2001).

6. Immunopathologie et physiopathologie

6.1. Stade 1, hémolympathique

Lors de l'infection, la réponse immunitaire de l'hôte va jouer un rôle prépondérant quant à la multiplication du parasite. Cependant, le parasite, qui possède un manteau antigénique composé de différentes glycoprotéines appelées VSG (variable surface glycoprotein) jouant un rôle dans la variation antigénique, va pouvoir être protégé des défenses spécifiques et non spécifiques de l'hôte. Ces VSG recouvrant presque la totalité de la surface du parasite rendent inefficaces les tentatives d'éliminations par les anticorps (Vickerman *et al.*, 1985). En effet, le manteau antigénique du parasite a la capacité de changer de VSG, ceci se traduit par environ 10 % du génome du trypanosome qui est utilisé pour l'encodage d'approximativement 1 000 formes de VSG différentes. Ces variations de VSG, provoque l'exposition d'un nouvel antigène à la surface du parasite. Or, les anticorps de l'hôte produits au même moment sont eux dirigés vers les anciens antigènes, ceci permet donc une multiplication des parasites plus rapide. Ce phénomène est ainsi répété, facilitant la survie du parasite dans l'organisme, et son échappement vis-à-vis du système immunitaire. Toutefois, la réponse immunitaire humorale va avoir une action sur l'élimination des trypanosomes qui n'auront pas changer leurs VSG.

Au sein des tissus, le contrôle de la prolifération parasitaire s'exerce avec l'immunité innée (macrophages, complément) et acquise (lymphocytes mémoires et anticorps) (Mansfield *et al.*, 2005).

A noter, le parasite possède deux types de VSG, les VSG solubles libérés par le parasite vivant, et les VSG membranaires. Ces deux genres de VSG vont avoir un impact sur l'activation des macrophages. De plus, l'implication du Toll-Like Receptor 9 (TLR9) et de sa molécule intracellulaire associée MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) dans l'activation des cellules présentatrices d'antigènes signe la réponse de type 1 de l'organisme (Drennan *et al.*, 2005). Les macrophages requièrent MYD88 afin de produire du TNF en réponse à la stimulation des VSG membranaires, toutefois, à l'inverse des VSG solubles, la réponse n'est pas dépendante d'une préstimulation d'IFN γ (Drennan *et al.*, 2005) . Il y a

également une production de radicaux libres (NO) et de dérivés nitrés pouvant être toxiques pour le parasite.

Les macrophages et cellules dendritiques activés par le parasite vont sécréter des interleukines IL12 et IL18, cytokines proinflammatoires activant par cascade les lymphocytes T helper (Th1), qui vont alors produire de l'IFN γ (Mansfield *et al.*, 2008).

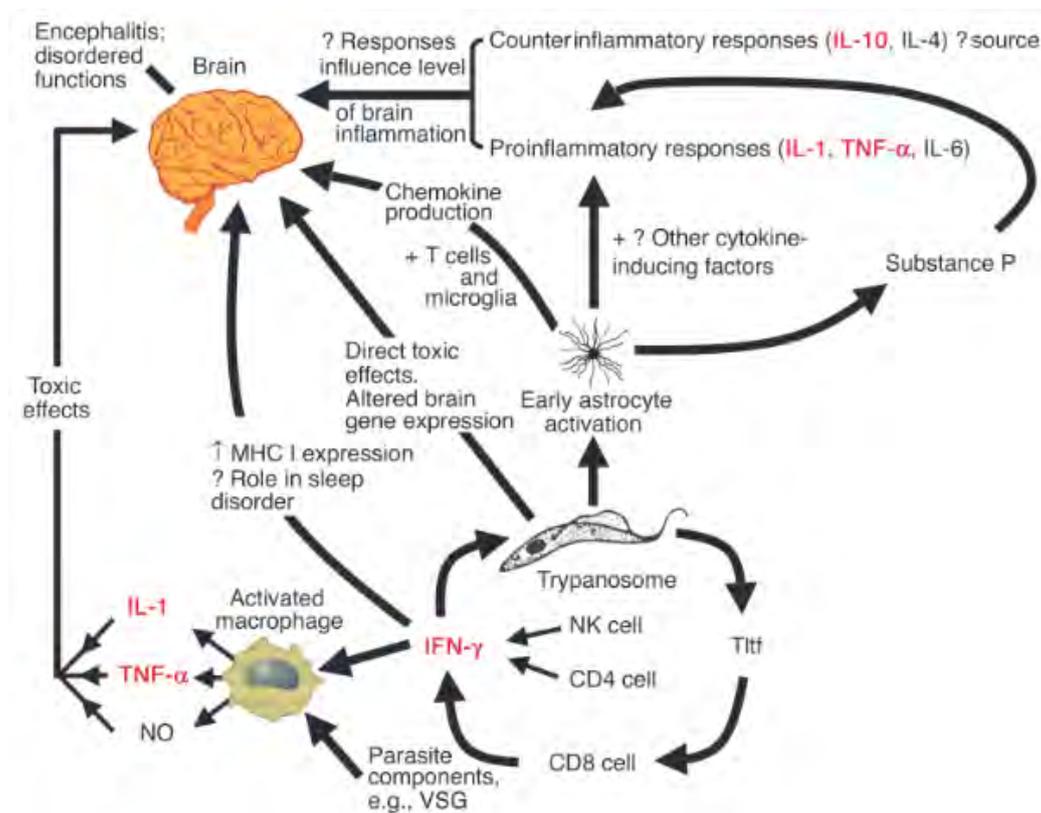


Figure 5. Les mécanismes immunopathologiques dans la THA (d'après Kennedy *et al.*, 2004)

De plus, les trypanosomes possèdent au sein de leur cytosquelette flagellaire une protéine appelée trypanine (Trypanosome Lymphocyte-Triggering Factor, TLTF), ayant un rôle dans la mobilité cellulaire (Hutchings *et al.*, 2002). Cette protéine une fois libérée à la capacité d'interagir avec les cellules de l'immunité et d'induire une stimulation des lymphocytes T CD8+ sécrétant de l'IFN γ (Vaidya *et al.*, 1997). Or, il a été montré que la production d'IFN γ favorisait la croissance des trypanosomes et que la concentration en trypanine avait un impact sur la parasitémie de l'hôte et le stade de l'infection (Hamadien *et al.*, 1999).

Au cours de l'infection, des facteurs immunosuppresseurs sont également libérés. Ils vont d'une part permettre de prévenir les éventuels dommages tissulaires, mais d'autre part, permettre aux trypanosomes d'échapper une fois de plus à l'élimination dans les tissus. Un de ces facteurs est la Prostaglandine E2 (PGE2) (Kubata *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les chémokines, médiateurs du recrutement et/ou de la rétention de cellules de l'inflammation dans les tissus peuvent être libérées à la suite d'une infection, après la reconnaissance par un récepteur de l'immunité innée de molécules microbiennes, ou encore indirectement par des cytokines sécrétées en réponse à une infection. L'une d'elles, l'IFN γ , cytokine pro-inflammatoire, joue un rôle paradoxal. En effet, elle va faciliter la pénétration des lymphocytes T au travers de la BHE tout en contrôlant la parasitémie. Effectivement, les chémokines pro-inflammatoires produites au moment de l'infiltration des globules blancs, ceci à proximité des organes périvericulaires, sont capables de se propager petit à petit à travers les barrières dans le parenchyme cérébral. Ceci a été montré lors d'une étude en 2009 par Amin *et al.*, travaillant sur une chémokine nommée CXCL10. En effet, l'expression de CXCL10 induite par la production d'IFN γ au niveau des astrocytes périvasculaires facilite le passage au travers de la BHE par des lymphocytes T, qui une fois passés vont sécréter de l'IFN γ , amplifiant le processus (Amin *et al.*, 2009).

6.2. Passage de la barrière hémato-encéphalique

Les globules blancs peuvent traverser la BHE à la suite de leur fixation aux cellules endothéliales de surface, et par ouverture d'une jonction serrée entre les cellules endothéliales (Engelhardt *et al.*, 2004). Ceci suggère donc que le parasite pourrait utiliser un système similaire pour traverser la BHE avec l'aide d'une cystéine protéase appelée Brucipain (trypanosome derived cathepsin L-like). En effet, Nikolskaia *et al.*, en 2006, ont démontré que la brucipain était un conducteur critique pour *T.b.gambiense*, de par son action sur les flux calciques. Le trypanosome traverse la BHE grâce à des signaux d'activation calcique au niveau des HBMECs (cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines) grâce à la brucipain (Nikolskaia *et al.*, 2006).

L'infiltration des cellules inflammatoires à travers la BHE se produit au niveau des veinules post capillaires et non des capillaires eux mêmes (Owens *et al.*, 2008). Ces veinules sont entourées par un espace péri-vasculaire bordé d'une membrane basale endothéliale et d'une membrane basale parenchymateuse formée de prolongements astrocytaires du nom de *glia limitans*. Les stades permettant le passage de ces globules blancs dans le parenchyme sont régulés par la composition biochimique de ces deux membranes basales (Owens *et al.*, 2008). La membrane basale endothéliale est la première à être franchie, ceci permet le passage des lymphocytes, qui se retrouvent donc dans l'espace périvasculaire. De là, des processus de franchissement de la *glia limitans* vont être initiés, permettant le passage des globules blancs

au travers. Cette traversée marque une étape importante dans l'apparition des signes de l'encéphalomyélite allergique expérimentale (Owens *et al.*, 2008).

De plus, la *glia limitans*, est ancrée par une sous-unité transmembranaire, la dystroglycane- β au niveau de la fin du pied astrocytaire. Cette dystroglycane peut être clivée sélectivement par les MMP-2 et MMP-9 (Matrix MetalloProtease), activées pendant l'inflammation. Ce type de clivage va alors créer un accès temporaire et localisé de la *glia limitans* permettant le passage des globules blancs dans le parenchyme cérébral (Agrawal *et al.*, 2006).

En 2004, Masocha *et al.*, se sont intéressés à ce passage. Sur des souris infectées par un clone de *T.b.brucei*, le passage de la *glia limitans* par les lymphocytes T et les parasites est facilité par l'IFN γ , à l'inverse, chez des souris déficientes pour le gène codant l'IFN γ , les trypanosomes sont alors capturés entre les deux membranes basales (Masocha *et al.*, 2004).

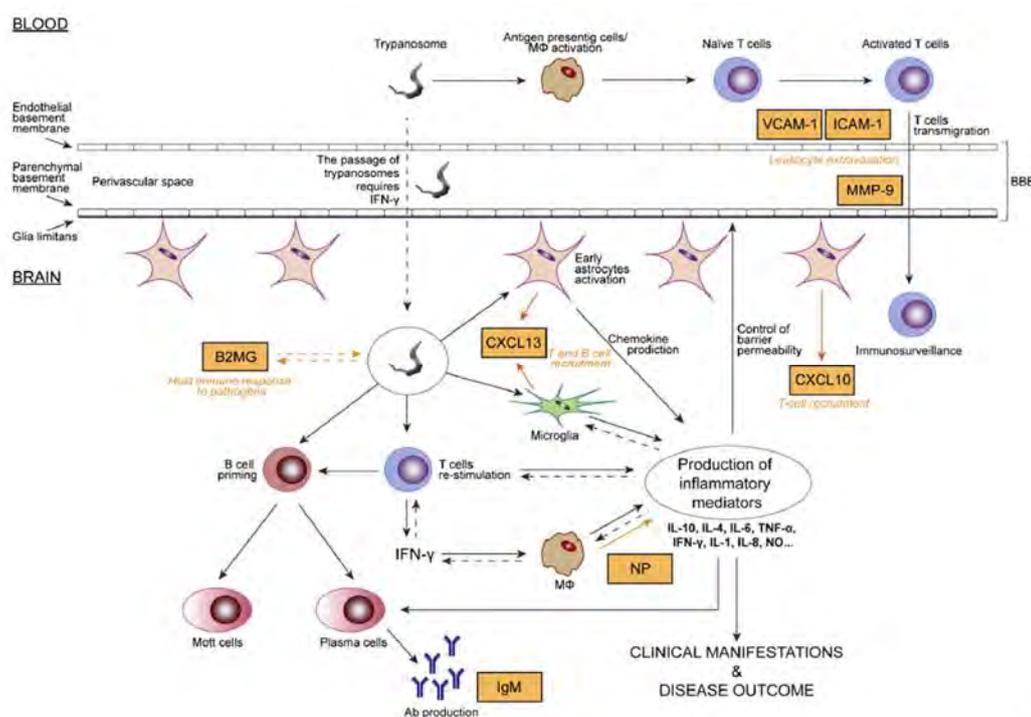


Figure 6. Principaux mécanismes impliqués dans l'inflammation encéphalique de la THA (d'après Tiberti *et al.*, 2013)

6.3. Stade 2, hémato-encéphalique

Dès lors que le parasite a franchi la BHE, il se retrouve au niveau du SNC, ce qui déclenche l'activation de cellules astrocytaires et microgliales jouant un rôle lors de l'inflammation par production de cytokines et chémokines (Raivich *et al.*, 2004). Les astrocytes du noyau suprachiasmatique qui correspondent à l'interface du système immuno-circadien, sont capables de répondre à la stimulation de Lipo-PolySaccharides (LPS), de cytokines proinflammatoires

tel le TNF α , et l'IL1 β , en augmentant l'expression de la protéine NF κ B (Nuclear factor- κ B) (Leone *et al.*, 2006).

L'intensité et la durée d'expression des cytokines vont être régulées à différents degrés. Les mécanismes mis en œuvre pour initier une réponse sont la concentration de base en cytokines, la régulation de l'expression des récepteurs à la surface cellulaire et les SOCS intracellulaires (Suppressors Of Cytokines Signaling, agents essentiels dans la régulation des cytokines) (Rakesh *et al.*, 2005).

Les cytokines peuvent donc toucher le fonctionnement d'un neurone en augmentant la libération d'un signal, et en provoquant une diminution des processus dépendants de la transcription. Ceci entraînant alors, une réaction en chaîne impliquant des transcrits de gènes. Les effets qui en découlent, peuvent survenir au niveau de la membrane neuronale et /ou synaptique, mais également au niveau de l'interaction neurones/cellules gliales. Par exemple, le TNF α , et l'IFN γ , deux cytokines proinflammatoires, sont des inducteurs potentiels des transcrits d'iNOS (inductible Nitric Oxyde Synthase), et de la production de NO jouant un rôle dans la croissance de *T.brucei* mais également dans la survenue des troubles nerveux (Kristensson *et al.*, 2010).

7. Diagnostic

Le diagnostic est complexe, et se base sur des examens de laboratoire, facilement réalisables sur le terrain, en raison des signes cliniques trop peu spécifiques (Chappuis *et al.*, 2004). Tout commence par un dépistage actif des populations lors de campagne de prospection. Le premier examen après l'interrogatoire du patient est un prélèvement sanguin afin d'effectuer un CATT ou test d'agglutination sur carte pour trypanosomose (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis). Ce test sérologique permet ainsi la recherche d'anticorps dirigés contre les trypanosomes. Sensible à 87-98% et spécifique à 93-95%, il est le mieux adapté et le plus efficace sur le terrain (Chappuis *et al.*, 2004 ; Penchenier *et al.*, 2003 ; Jamonneau *et al.*, 2000).

- Si la personne ne présente pas d'anticorps, le test est négatif, elle est donc saine et est exclue.
- Si le test est positif, une recherche de ganglions est effectuée par palpation à la base du cou (Kennedy *et al.*, 2013) :
 - Soit les ganglions sont absents,
 - Soit les ganglions sont présents. Une ponction ganglionnaire est alors effectuée et sera analysée pour mettre en évidence la présence de trypanosomes.

- Soit les trypanosomes sont absents,
- Soit les trypanosomes sont présents, le patient est donc atteint de la THA. Une étude du stade sera nécessaire pour mettre en place le traitement approprié.

Dans les cas des absences (ganglions ou trypanosomes dans ganglions), une technique de CTC (Centrifugation en Tube Capillaire) sur sérum est effectuée, pour concentrer les anticorps. Cette technique peut être réalisée jusqu'à 16 fois (Chappuis *et al.*, 2005).

Se pose deux cas :

- La CTC est négative avec une titration inférieure à 1/8, la personne est considérée comme saine et est exclue du dépistage.
- La CTC est positive, avec une titration supérieure à 1/8, le patient est donc atteint de la THA.

Pour les deux situations, où la CTC est positive et que des trypanosomes sont retrouvés dans les ganglions, une ponction lombaire est effectuée afin de déterminer le stade de la maladie par analyse du LCR et ainsi orienter le traitement. Pour parler de stade 2, l'OMS a stipulé qu'il était nécessaire de retrouver dans le LCR des trypanosomes, et/ou d'avoir une cytorachie supérieure ou égale à 5 cellules par microlitre de LCR, et/ou d'avoir une protéinorachie supérieure à 370mg par litre de LCR (OMS, 1998). Si aucune de ces caractéristiques n'est retrouvée, mais que le patient a été présenté comme atteint de la maladie, il est alors en stade 1 et sera traité avec les médicaments adéquats.

Cette approche de dépistage est utilisable sur le terrain. Il n'en reste pas moins que d'autres méthodes peuvent être utilisées. En effet, concernant le CATT, il est parfois difficile à appliquer aux régions non endémiques, où des tests ELISA ou d'immunofluorescence y seront préférés car plus sensibles. L'examen par goutte épaisse ou frotti mince peut, également, être réalisé, mais pour cela une technique de concentration telle la mAECT (mini Anion Exchange Centrifugation technique), ou le QBC (Quantitative Buffy Coat technique) sont utilisés (Lumsden *et al.*, 1979).

De plus concernant, la technique de CTC, certains chercheurs recommandent le traitement des personnes ayant une titration supérieure à 1/16, notamment dans des pays à fort taux de prévalence où les méthodes de détection sanguine les plus sensibles ne peuvent être utilisées, et ceci même si leurs examens parasitologiques sont négatifs (Kennedy *et al.*, 2013).

Toutefois, ces différentes méthodes restent encore trop délicates pour la mise en évidence réelle d'un diagnostic de stade. D'où la recherche et le développement de méthodes plus sûres, relancés en 2006 par FIND (Foundation for innovative new diagnosis) et actuellement en étude au sein de l'UMR INSERM 1094 de Limoges (Bisser *et al.*, 2012).

8. Métabolisation de molécules thérapeutiques

La métabolisation d'une molécule consiste en une réaction biochimique (biotransformation) le plus souvent catalysée par une enzyme. Le médicament «molécule mère» va être biotransformé en un ou plusieurs métabolites actifs ou inactifs. Différents tissus tels les poumons, la peau, les reins ou les intestins sont capable de réaliser cette biotransformation. Toutefois, le foie est le site principal de biotransformation, grâce à la présence d'enzymes hépatiques présentes au niveau des microsomes. Il reçoit près de 1,5 litres de sang par minute ce qui en fait l'organe épurateur majoritaire de l'organisme.

Le rôle de la métabolisation des molécules est de conduire à la formation de substances hydrosolubles pouvant être plus facilement éliminées par les milieux aqueux de l'organisme (urine, bile, sueur, ou salive).

Cette réaction fait intervenir différents types d'enzymes en fonction des phases de métabolisation (Loichot *et al.*, 2004).

- A la suite de l'entrée d'une molécule dans l'organisme, les enzymes de phase 1 vont participer à la réaction de fonctionnalisation afin de produire des métabolites dits de phase 1.

On retrouve alors trois principales voies de synthèse de métabolites de phase 1 :

- ◆ Les réactions d'oxydation, majoritaires au sein des microsomes hépatiques. Elles consomment du NADPH, de l'oxygène moléculaire. Ces réactions font intervenir les cytochromes P450 (CYP450).
- ◆ Les réactions de réduction, beaucoup moins fréquentes. Elles ne se produisent pas exclusivement dans le foie, on les retrouve au niveau intestinale *via* la flore bactérienne.
- ◆ L'hydrolyse, voie métabolique dite « banale », intervient au niveau hépatique, plasmatique ou dans divers tissus.

Ces trois types de réaction conduisent donc à la formation de dérivés possédant des groupements fonctionnels de type hydroxyles (-OH), amines (-NH₂) ou encore des carboxyles (-COOH).

Les métabolites issus de cette réaction de phase 1, ont deux devenir. Ils peuvent soit être directement éliminés, soit poursuivre le processus de métabolisation par la phase 2.

- Les enzymes de phase 2 intervenants dans les réactions de conjugaison vont produire des métabolites secondaires en transférant un groupement polaire sur le médicament directement ou sur les métabolites de la phase 1. Ainsi les molécules sont plus hydrophiles et seront éliminées par la bile ou les urines. On retrouve différentes réactions de conjugaison :

- ◆ Glucurono-conjugaison,
- ◆ Sulfo-conjugaison,
- ◆ Acétylation,
- ◆ Alcoylation...

La réaction de glucurono-conjugaison reste la voie majoritaire. Elle est catalysée par le système enzymatique de la glucuronyltransférase. Les métabolites issus de cette phase sont très hydrosolubles, ce qui explique la facilité à laquelle ils sont éliminés de l'organisme (Loichot *et al.*, 2004).

De plus, lorsqu'un médicament est métabolisé, il l'est rarement de manière unique. Plusieurs voies métaboliques sont possibles, entraînant la formation de divers métabolites par toujours identifiés. Si un médicament pris par voie orale a une forte affinité pour les enzymes hépatiques, il aura une faible biodisponibilité due à l'effet de premier passage hépatique.

9. Traitements

9.1. Traitements actuels

Les traitements actuels sont « stades dépendants » et « espèces dépendantes ». Ils ont été mis sur le marché entre les années 1920 et 1980.

L'ensemble de ces médicaments est donné à l'OMS par les fabricants au nom d'un contrat de partenariat public-privé créé en 2001 et se poursuivant jusqu'à éradication de la maladie (OMS 2013).

	Stade	Souche	Dosage	Effets indésirables
Pentamidine	Stade 1	<i>T.b.gambiense</i>	4mg/kg/jour pendant 7 jours IM	Hypotension, diarrhées, douleurs au site d'injection, nausées, vomissements
Suramine	Stade 1	<i>T.b.rhodesiense</i>	100-200mg 1 ^{er} jour, puis maximum 1g par injection pendant 7 jours IV	Eruptions cutanées, prurit, vomissements, neuropathies périphériques, hématurie
Mélarsozol	Stade 2	<i>T.b.gambiense / T.b.rhodesiense</i>	2.2mg/kg/jour pendant 10 jours (<i>T.b.g</i>) 3x 3.6mg/kg/jour pendant 7 jours (<i>T.b.r</i>) IV	Encéphalopathie arsenicale, réactions cutanées, neuropathies, paresthésies
Eflornithine	Stade 2	<i>T.b.gambiense</i>	100mg/kg/6heures pendant 14 jours IV	Diarrhées, nausées, vomissements leucopénie, anémie
Eflornithine / Nifurtimox	Stade 2	<i>T.b.gambiense</i>	200mg/kg/12heures pendant 7 jours (Eflornithine) IV + 5mg/kg/3xjour pendant 10 jours (Nifurtimox) PO	<i>Idem Eflornithine</i> + anorexie, douleurs abdominales, hépatite

Tableau 1. Médicaments utilisés dans la THA

9.2. Mécanisme d'action de ces molécules

❖ La Pentamidine

Découvert en 1941 comme agent antiprotozoaire, la Pentamidine est une diamidine aromatique commercialisée sous forme de sel de Diisethionate (Pentacarinat[®], Nepubent[®], et Pentam[®]) et de Dimesylate (Lomidine[®]). Elle est donnée aux patients atteints du stade 1 de la THA due à *T.b.gambiense*. Elle peut également être utilisée dans le traitement de *Leishmania donovani* résistante aux antimoniés et *Pneumocystis carinii*, pour des patients présentant une intolérance au traitement de première ligne Sulfamethoxazole-Triméthoprime (Damper *et al.*, 1976 ; Drake *et al.*, 1985).

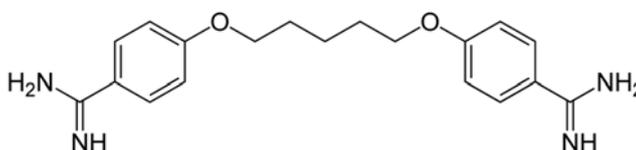


Figure 7. Structure de la Pentamidine

La Pentamidine sous sa forme de sel Diisethionate, est très soluble dans l'eau, et relativement instable en solution ; elle doit donc être préparée de manière extemporanée et administrée par voie veineuse ou intramusculaire. De plus, au pH physiologique, les diamidines sont presque toutes saturées en hydrogène au niveau de chacun des groupes amidines, ceci entraîne donc une mauvaise absorption après prise orale mais également un faible passage de la BHE. Ce mauvais passage rend la molécule inefficace pour traiter le stade 2 de la maladie (Fairlamb *et al.*, 2003).

L'activité de cette molécule et des autres diamidines dépend de leur capacité d'assimilation par les parasites. En effet, une des portes d'entrée de la Pentamidine a été reconnue comme étant le transporteur d'amino-purines de type 2 appelé P2 qui transporte à la fois l'adénine et l'adénosine dans les cellules (Carter *et al.*, 1995 ; De Koning *et al.*, 2001). En 2001, un nouveau transporteur a été identifié et a permis de comprendre l'hypothèse émise sur le fait que certains parasites pouvaient être sensibles à l'action de la Pentamidine et non à d'autres molécules tout en étant dénués du transporteur P2 (Hubert *et al.*, 2001 ; De Koning *et al.*, 2001). Tout comme le fait que certains parasites par l'action de résistance croisée, pouvaient être résistants à l'action de la Pentamidine alors que d'autres non (Barrett *et al.*, 1999 ; De Koning *et al.*, 2000). Ce transporteur fut nommé HAPT1 pour "High-affinity pentamidine transporter 1", mais son identité génétique n'est pas encore connue. Il existe également un autre transporteur nommé

LAPT1 pour “Low-affinity pentamidine transporteur 1” (De Koning *et al.*, 2001). En 2014, Munday *et al.*, ont montré l’intérêt de ces transporteurs ainsi que le rôle important d’une aquaglycéroporine appelé TbAQP2 pour *T.brucei* aquaglyceroporin 2 qui va permettre l’absorption de la pentamidine mais également du melaminophényl arsenic, le mélarsoprol (Munday *et al.*, 2014).

Toutefois, le mécanisme d’action de cette molécule est loin d’être élucidé. 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 apparaît comme étant un médicament liant les acides nucléiques et s’accumulant à des concentrations de l’ordre du millimole dans les cellules, en réduisant le potentiel de membrane des mitochondries des trypanosomes (Lanteri *et al.*, 1994). De plus, elle va se lier à toutes sortes de composants cellulaires chargés négativement, tels que l’ADN (Acide Désoxyribonucléique), l’ARN (Acide Ribo-Nucléique), phospholipides, et de nombreuses enzymes (Bailly *et al.*, 1994 ; Kappagoda *et al.*, 2011). On la retrouve 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). Par ailleurs la Pentamidine entraîne un clivage de l’ADN circulaire du kinétoplaste en créant ainsi un ADN linéaire comme peut le faire un inhibiteur de topoisomérase II (Shapiro *et al.*, 1990). Toutefois, il reste encore à confirmer cette hypothèse.

En 1993, Benaim *et al.*, démontraient l’action inhibitrice de la Pentamidine sur la Ca^{2+} -ATPase, mais également, une faible action anti-calmoduline sur la pompe calcique des membranes érythrocytaires (Benaim *et al.*, 1993). Une autre enzyme inhibée réversiblement *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).

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 *Carinii* (Liu *et al.*, 1994). Il est possible que l’ARN synthétisé par les trypanosomes soit touché de façon similaire par la Pentamidine.

Une autre diamidine, le Berenil[®] ou diminazene aceturate, est quant à lui réservé à l’usage vétérinaire pour le traitement de la trypanosomose appelée Nagana (De Koning *et al.*, 2004). Il agit généralement de la même manière que la pentamidine, utilise le transporteur P2 et inhibe l’AdoMetDC de manière irréversible cette fois-ci (Bitoni *et al.*, 1986).

❖ La Suramine

La Suramine (205 Bayer[®], Germanine[®], Fourneau 309[®], Moranyl[®]) apparue en 1921, appartient à la famille des naphtylamine sulfonées polyanioniques colorantes, chimiquement proche du Bleu et du Rouge de Trypan possédant une activité anti-trypanosome (Morgan *et al.*, 2011). Efficace sur le stade 1 de la maladie à *T.b.rhodesiense*, mais également à *T.b.gambiense*, elle est évitée contre cette dernière forme en Afrique de l'Ouest et Centrale ; où sévit l'onchocercose à *Onchocerca volvulus*. La Suramine est certes efficace contre les deux parasites, mais la mort de l'onchocercerque produit une réaction allergique de type choc anaphylactique qui empêche son emploi dans ces régions (Brun *et al.*, 2010).

Concernant ces caractéristiques chimiques, cette molécule de masse molaire élevée et de haute polarité ne peut franchir la BHE à pH physiologique ce qui l'empêche d'agir sur le stade 2 de la maladie. De plus, facilement dégradée au contact de l'air, elle doit immédiatement être injectée en intraveineuse (IV) après dilution dans l'eau.

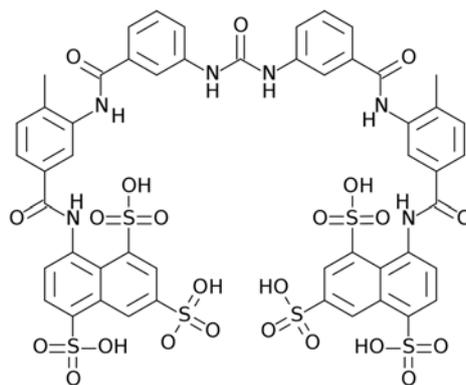


Figure 8. Structure de la Suramine

Une explication à la toxicité sélective de la Suramine a pu être donnée par la capacité des trypanosomes à l'accumuler. En effet, en 1980, Fairlamb *et al.*, ont démontré l'implication de protéines sériques dans l'absorption de Suramine par les trypanosomes et ceci grâce à la présence de protéines sériques permettant une endocytose de la molécule et une libération dans la cellule en plus grande quantité. De plus, la Suramine est capable d'inhiber la production d'ATP par son action combinée sur l'oxydase du glycérol-3-phosphate et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase NAD⁺ dépendant provoquant ainsi la mort de l'organisme. Mais beaucoup reste à confirmer et à découvrir (Fairlamb *et al.*, 1980).

Une fois la Suramine introduit dans le trypanosome, le mécanisme d'action reste hypothétique. Malgré son action inhibitrice contre de nombreuses enzymes trypanosomiales, les mécanismes

impliqués restent flous. Une étude sur *T.brucei* réalisé en 1972, par Jaffe *et al.*, a permis de montrer l'inhibition de la dihydrofolate réductase par la Suramine. Dans la continuité, Chello *et al.* en 1972, et Morty *et al.*, en 1998, ont montré ses propriétés inhibitrices de la thymidine kinase impliquant l'inhibition de la sérine oligopeptidase cytosolique des trypanosomes (Jaffe *et al.*, 1972 ; Chello *et al.*, 1972 ; Morty *et al.*, 1998).

La Suramine a été caractérisée comme un inhibiteur des enzymes de la glycolyse, avec une action importante sur la pyruvate kinase (Opperdoes *et al.*, 1984 ; Misset *et al.*, 1987). Toutefois, l'inhibition de ces enzymes entrainerait la mort et la lyse rapide des trypanosomes totalement dépendants de la glycolyse pour leur production énergétique. Or, les études montrent que les trypanosomes mis en présence de Suramine meurent sur plusieurs jours (Fairlamb *et al.*, 1980).

La Suramine possède également, une activité inhibitrice de la reverse transcriptase du VIH avec une activité antivirale présente (Take *et al.*, 1989). Son intérêt dans le traitement de certains cancers a été étudié et a montré ses capacités d'inhibition enzymatique et antiprolifératives contre de nombreuses tumeurs métastatiques (Barret *et al.*, 2000).

Cette molécule se lie fortement aux protéines lors d'une injection IV (99.7% de liaison pour 1 gramme d'administration). Sa longue demi-vie de l'ordre de 90 jours, est notamment due à ces liaisons et permet donc une utilisation prophylactique (Pépin *et al.*, 2001). De plus, concernant son élimination, la Suramine est très faiblement métabolisée, et près de 80% est éliminé par la fonction rénale.

❖ Le Mélarsoprol

Le Mélarsoprol (Mel B[®], Arsobal[®]), est une molécule découverte en 1949. Il associe un dérivé de l'Arsenic, l'oxyde de Melarsen, à un chélateur de métaux lourds, le 2,3-dimercaptopropanol (Ericsson *et al.*, 1997). Il est employé pour traiter le stade 2 de la THA à la fois pour *T.b.gambiense* et *T.b.rhodesiense* (Sekhar *et al.*, 2014).

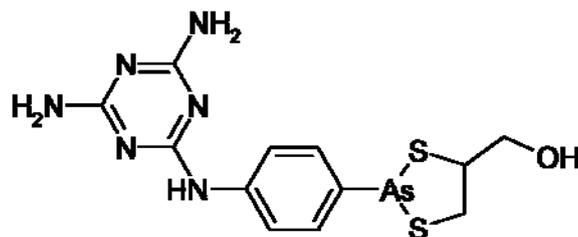


Figure 9. Structure du Mélarsoprol

Un des gros problèmes de ce médicament, est la présence de nombreux effets indésirables dont notamment le plus grave pouvant apparaître dans 10 % des cas traités, est une encéphalopathie arsenicale, mortelle pour la moitié des patients (Pépin *et al.*, 2001). De plus, l'apparition de résistances observés chez 30 % de patients atteints de THA à *T.b.gambiense*, pose un autre problème quant aux traitements alternatifs à proposer, et quant au devenir du mélarsoprol (Bisser *et al.*, 2007 ; Brun *et al.*, 2010).

Il est insoluble dans l'eau, et est donc injecté dans une solution de propylène glycol à 3,6 % avec une seringue en verre de manière lente du fait de la causticité du propylène glycol pouvant attaquer les tissus au niveau du site d'injection (Raber *et al.*, 2013).

Le Mélarsoprol traverse la BHE afin d'agir et d'éliminer les trypanosomes présents dans le SNC. Il inhibe les enzymes de la glycolyse, la phosphogluconate deshydrogénase ainsi que la trypanothione réductase par formation d'un complexe stable avec la Trypanothione, qui est essentielle à l'homéostasie rédox du trypanosome (Fairlamb *et al.*, 1989). Ce complexe est à l'origine de la formation d'un adduit appelé Mel-T, qui inhibe ainsi la Trypanothione réductase de *T.brucei*. Or cette enzyme est primordiale pour maintenir la Trypanothione sous sa forme réduite. L'association inhibition de la Trypanothione réductase/ diminution de la Trypanothione, serait donc à l'origine de la mort du trypanosome (Cunningham *et al.*, 1994 ; Loiseau *et al.*, 2000).

Concernant les enzymes de la glycolyse, l'inhibition est celle de la pyruvate kinase, qui va entraîner une accumulation de phosphoenolpyruvate dans les cellules en suspension. Mais cette inhibition commence bien avant, au niveau de la 3^{ème} étape de glycolyse, par inhibition du fructose-2,6-biphosphate, activateur allostérique de la phosphofructokinase1 (PFK1) permettant le passage du fructose-1-phosphate en fructose-1,6-biphosphate. L'oxyde de melarsen a donc montré un fort pouvoir inhibiteur sur la phosphofructokinase 2 (PFK2) entraînant ainsi une diminution du taux de fructose-2,6-biphosphate et donc par cascade une inhibition de la pyruvate kinase (Van Schaftingen *et al.*, 1987).

Il a été montré que l'excrétion du Mélarsoprol chez le rat notamment se déroulait principalement par la bile sous forme glucuronée, ou métabolisé en un conjugué diglutathione-Melarsen (Gregus *et al.*, 2000).

Etant un précurseur médicamenteux, il va après administration se transformer en un métabolite actif, l'oxyde de Mélarsen possédant un temps de demi-vie de 30 minutes. L'oxyde de Mélarsen

disparaît rapidement du sérum, en effet sa concentration plasmatique est atteinte 15 minutes après administration et son temps de demi-vie est de 3,9 heures sous forme libre (Keiser *et al.*, 2000). Cependant, il est capable de se lier rapidement et réversiblement aux protéines sériques par des complexes non identifiés Protéine-S-As ou Protéine-N-As, permettant la formation d'un réservoir où sont stockés les arsenicaux mélaminophényl avant d'être relargués avec une demi-vie de 35 heures dans le sérum et de 120 heures dans le LCR. Ces arsenicaux mélaminophényls trypanocides sont ainsi détectables par dosage.

L'oxyde de Mélarsen est pris en charge par le transporteur TbAT1/P2 (tout comme la Pentamidine) des trypanosomes circulants (Schweingruber *et al.*, 2004). Or c'est à cause de la perte de ce transporteur chez certains trypanosomes que des cas de résistances sont apparus pour le Mélarsoprol et ses dérivés (Carter *et al.*, 1995 ; De Koning *et al.*, 2000). De plus, la TbAQP2 impliqué également dans le transport de la Pentamidine, jouerait un rôle dans le développement de résistances. En effet, la perte de ce transporteur induirait l'apparition de résistances appelées MPXR pour melarsoprol-pentamidine cross-resistance (Munday *et al.*, 2014, 2015).

L'oxyde de Melarsen peut former des complexes avec différents types d'enzymes comme par exemple, avec la dihydrolipamide déshydrogénase, ou d'autres protéines possédant des résidus cystéines proches entre eux (Fairlamb *et al.*, 1992). C'est notamment ces associations non spécifiques qui sont à l'origine des nombreux effets indésirables de ce médicament. Toutefois la dihydrolipamide déshydrogénase ne joue aucun rôle dans les phénomènes de résistance (Fairlamb *et al.*, 1992).

Le Mélarsoprol, puissant trypanocide, présente de dangereux effets indésirables comme l'encéphalite arsenicale pouvant être fatale dans 10 à 15 % des cas (Blum *et al.*, 2001). Mais la grande question est pourquoi une telle réaction. Plusieurs hypothèses ont été émises, comme la liaison du Mélarsoprol ou de ses métabolites aux protéines, par liaisons covalentes, entraînant la formation d'un antigène déclenchant une réaction immunitaire, ou encore la libération de nombreux antigènes dans le SNC après lyse des trypanosomes (Hess *et al.*, 1997 ; Pépin *et al.*, 2001). Pour lutter contre elle, l'association Mélarsoprol/corticoïdes semblent fonctionner (Laveissière *et al.*, 2005).

❖ L'Eflornithine

L'Eflornithine ou α -difluoromethylornithine (DFMO) (Ornidyl®), est la plus récente des molécules actives contre la THA. Apparue en 1981, elle lutte contre le stade 2 de la THA à *T.b.gambiense*, offrant de ce fait une alternative au Mélarsoprol (Sekhar *et al.*, 2014). Toutefois, initialement, l'Eflornithine était utilisée dans les affections néoplasiques.

Poudre cristalline soluble dans l'eau, elle est donnée aux patients sous forme injectable en IV. Relativement cher, elle est préférée comme traitement des deuxième périodes de rechute à *T.b.gambiense* pour le stade nerveux de la maladie. L'Eflornithine manque d'action contre *T.b.rhodesiense* (Laveissière *et al.*, 2005).

L'Eflornithine est rapidement éliminée, avec 80 % de la dose administrée qui se retrouve sous forme inchangée dans les urines avec un temps de demi-vie de 3 heures. D'où la nécessité lors de la prescription de ce médicament de contrôler la fonction rénale du patient (Laveissière *et al.*, 2005).

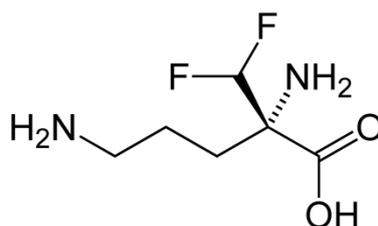


Figure 10. Structure de l'Eflornithine

Cette molécule est décrite en 1978 par Metcalf *et al.* comme un inhibiteur de l'Ornithine décarboxylase (ODC) (Metcalf *et al.*, 1978). L'ODC est une enzyme essentielle et de vitesse limitante dans la voie amenant à la biosynthèse des polyamines nécessaires à la croissance des cellules. Agissant comme cytostatique, elle bloque ainsi les enzymes permettant la prolifération des trypanosomes. En effet, les premières études sur l'effet de la molécule sur des cellules en culture ont décrit un rapidement épuisement des polyamines Putrescine et Spermidine. En effet la Putrescine est obtenue à partir de l'Ornithine par décarboxylation par l'Ornithine décarboxylase, et la Spermidine est synthétisée à partir de la Putrescine. L'ODC est présente chez les cellules eucaryotes de mammifères, chez *Trypanosoma brucei*, chez *Saccharomyces cerevisiae* notamment en présentant de nombreuses similitudes (Poulin *et al.*, 1992). En effet, l'ODC humaine partage 99 % de similitude d'ADN avec l'ODC murine, et cette dernière possède 61,5 % de séquence identiques avec l'ODC de *T.b.brucei* (Phillips *et al.*, 1987 ; Poulin *et al.*, 1992). De plus, la structure cristalline de l'ODC de *T.b.brucei* complexé à l'Eflornithine,

dévoile que cette molécule forme une liaison covalente avec une cystéine 360, comme cela a été montré avec l'ODC murine (Grishin *et al.*, 1999).

Son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé, cependant, Phillips *et al.*, ont réussi à montrer que malgré la forte ressemblance entre les ODC de souris et de *T.b.brucei* à l'inhibition par l'Eflornithine, une différence existait au niveau de la présence d'un extra-peptide de 36 acides aminés situé au niveau C-terminal de l'enzyme murine. Cet extra-peptide comprenant, une séquence appelée PEST riche en Proline, acide glutamique (E), Sérine et Thréonine présente chez de nombreuses protéines eucaryotes, était à l'origine de la capacité de renouvellement rapide de ces dernières (Rechsteiner *et al.*, 1996). Or, chez l'ODC de *T.b.brucei* très stable, ce renouvellement ne s'effectue pas suffisamment pour permettre la survie de l'enzyme du trypanosome entraînant ainsi sa mort (Phillips *et al.*, 1988). Par la suite Ghoda *et al.*, en 1990 ont expliqué que l'ODC de souris était beaucoup moins stable que celle de *T.b.brucei* (Ghoda *et al.*, 1990). De plus, lorsque le matériel génétique codant pour l'ODC murine est placé et exprimé chez *T.b.brucei*, on observe que l'enzyme reste stable, suggérant ainsi une voie de dégradation faible ou inactive chez le parasite (Bass *et al.*, 1992 ; Hua *et al.*, 1995).

L'Eflornithine est utilisée pour lutter contre *T.b.gambiense*, mais n'agit pas sur *T.b.rhodesiense*. L'explication à ce phénomène est incertaine, toutefois Iten *et al.*, en 1997, ont émis l'hypothèse que cela viendrait d'un état réfractaire de *T.b.rhodesiense* possédant un taux de renouvellement de son ODC plus élevé (Iten *et al.*, 1997). En effet, ils ont montré que malgré le peu de différences d'absorption d'Eflornithine ou de Putrescine entre des souches de *T.b.gambiense* sensibles et de *T.b.rhodesiense* réfractaires, et le manque de significativité dans l'inhibition de l'ODC par l'Eflornithine, l'activité de l'ODC des souches réfractaires de *rhodesiense* étaient trois fois plus importantes avec un taux de renouvellement bien plus élevée que chez les souches sensibles de *gambiense* (Iten *et al.*, 1997).

En 1993, c'est Bacchi *et al.* qui avaient montré qu'une altération dans le métabolisme AdoMet (S-AdenosylMéthionine) pouvait être à l'origine de la résistance présente chez la souche *T.b.rhodesiense* avec ainsi une tolérance accrue à l'Eflornithine (Bacchi *et al.*, 1993).

En résumé, l'Eflornithine en agissant sur l'ODC, épuise les réserves en polyamines, entraîne une baisse de synthèse de macromolécules, notamment celles des antigènes variant de surface au niveau des VSG. Les trypanosomes, sont alors, incapables de croître et de synthétiser de

nouveaux variants antigéniques, et finissent par être détruit par le système immunitaire de l'hôte (Laveissière *et al.*, 2005 ; Bitonti *et al.*, 1996).

❖ Le Nifurtimox

Le Nifurtimox ou 5-nitrofurane, est une molécule initialement utilisée dans le traitement de la trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas.

Son utilisation dans la THA n'est pas envisagée en monothérapie, mais il est employé dans une association avec l'Eflornithine dénommée NECT (Nifurtimox-Eflornithine Combinaison Therapy). Cette association est envisagée notamment dans le traitement à *T.b.gambiense* lors de cas de résistances à l'Eflornithine utilisée en monothérapie. De plus cette combinaison semble plus efficace qu'une monothérapie et permet de réduire la durée de traitement (Priotto *et al.*, 2009). Un des avantages de son emploi est sa prise par voie orale facilitant la prise en charge des patients.

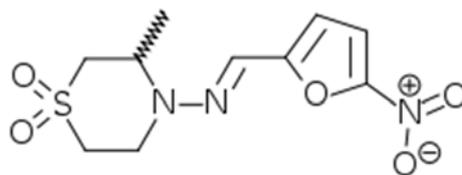


Figure 11. Structure du Nifurtimox

Son mécanisme d'action implique une réaction d'activation initiale catalysée par une nitroréductase de type 1 (NTR1), enzyme retrouvée notamment dans les cellules procaryotes, et conduisant à un métabolite cytotoxique nitrile non saturé à chaînes ouvertes (Bot *et al.*, 2013). De plus, cette NTR va entraîner la libération de radicaux oxygénés, aboutissant à une diminution de protéines, une baisse de la synthèse d'acides nucléiques, des cassures d'ADN, et une inhibition de la croissance parasitaire par stress oxydatif (Hall *et al.*, 2011). Toutefois, ce mécanisme reste encore incompris.

Malheureusement, ces médicaments présentent des limites d'utilisation d'une part par leur sélectivité de stade et d'espèces, et d'autre part par le développement de résistances freinant ainsi leur action dans les populations de malades.

C'est pourquoi l'étude de nouveaux traitements anti-THA est primordiale, et repose sur l'idée de trouver une molécule sûre et efficace, facile d'emploi avec une préférence pour la voie orale, sans effet indésirable, active sur les deux stades et les deux espèces et à faible coût (Bisser *et al.*, 2012).

9.3. Etude des nouveaux traitements

En 2011, la Pafuramidine maléate (DB289), dérivé de la Pentamidine, arrive en phase 3 des essais cliniques avant de s'arrêter brutalement en raison d'effets indésirables de types hépatiques et rénaux (Jacobs *et al.*, 2011).

Une autre molécule, toujours en essai clinique, et encourageant quant à son avenir, est le Fexinidazole (5-nitro-imidazole) (Eperon *et al.*, 2014).

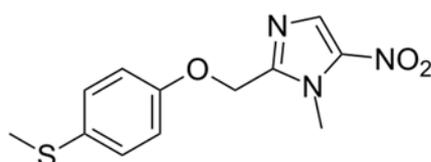


Figure 12. Structure du Fexinidazole

Cette molécule découverte en 1980 par le DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative) et développé conjointement avec Sanofi-Aventis, présente un fort intérêt dans le traitement des deux stades de la THA de par une sécurité d'emploi, et une prise orale sur un temps court. En effet, proche du Mégazol, et non dénué de mutagénicité, a pu passer en phase clinique de son développement et est actuellement en phase 3 des essais cliniques dans des centres d'étude en République Centre africaine, et en République démocratique du Congo (Tweats *et al.*, 2012 ; Torreele *et al.*, 2010 ; Tarral *et al.*, 2014).

La dernière molécule actuellement à l'étude, est le Benzoxaborole (SCYX-7158). Cette molécule est issue de la famille des oxaboroles, et est développée par Anacor Pharmaceuticals. Après des essais précliniques concluants, elle se trouve en phase 1 des essais cliniques. Ses avantages sont la prise par voie orale, et l'action sur les deux stades de la maladie (Eperon *et al.*, 2014 ; Jacobs *et al.*, 2011).

En 2014, un analogue dipyridylbenzène du DB289 (Pafuramidine), le 28DAP010 a été proposé comme un candidat prometteur pour des tests précliniques à venir. Il serait employé dans la lutte du stade 2 de la THA (Wenzler *et al.*, 2014).

9.4. Mégazol

Le Mégazol est un composé nitré dérivé du 5-nitroimidazolés, de formule brute :

2-amino-5-(1-méthyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1-3-4-thiadiazole.

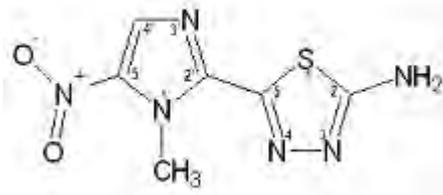


Figure 13. Structure du Mégazol

9.4.1. Activité biologique

Il a été synthétisé pour la première fois en 1968 par les chercheurs d'American Cyanamid, pour sa diversité d'activités biologiques à la fois sur les infections bactériennes et parasitaires (Berkelhammer *et al.*, 1968).

Il possède une action antibactérienne, par activité *in vitro* sur cultures de gonocoques, méningocoques, bacilles Gram + et Gram -, et par test *in vivo* sur modèle murin et aviaire avec infections Gram +, Gram - et cocci.

Mais aussi une action antiparasitaire, sur *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma equiperdum* et sur *Trypanosoma cruzi*.

Lors des premiers tests effectués en 1977, sur un modèle murin parasité avec *T. brucei*, et *T. cruzi*, les résultats furent encourageants (Winkelmann *et al.*, 1977). Ceci permit en 1982, de continuer les tests et de démontrer une efficacité sur des infections à *T. brucei*, ainsi qu'à des souches résistantes au Nifurtimox et au Benznidazole (Filardi *et al.*, 1982). Par la suite, son efficacité par destruction des formes intracellulaires de *T. cruzi* fut démontrée, là où le Nifurtimox et le Benznidazole ne semblent pas efficaces (Lages-Siva *et al.*, 1990).

Pour ce qui est de son activité biologique sur les trypanosomes du genre *brucei*, des tests initiaux *in vitro* ont été menés sur une souche de *T.b.brucei* AnTat 1.9 cultivé en milieu acellulaire semi-synthétique. Ces études ont montré l'efficacité du Mégazol à 0,1µg/mL ou 0,45 µM après 36 heures d'incubation (Bouteille *et al.*, 1995). Cette efficacité est 10 fois plus importante qu'avec la Suramine au même temps d'incubation mais avec une concentration plus élevée de l'ordre de 1µg/mL ou 0,7µM (Bouteille *et al.*, 1995).

En continuité des tests *in vitro*, des tests *in vivo* sur modèle murin ont été conduit. Les souris sont parasitées par une souche de *T.b.brucei* AnTat 1.9, entraînant une forme aiguë de la maladie sans atteinte cérébrale et provoquant la mort des rongeurs en 3 à 4 jours post-infection. Après administration d'une dose unique de Mégazol à 20mg/Kg soit 0,5mg/souris pour des souris de 25 grammes, il a été constaté 100 % de guérison pour des infections entre 12 et 24 heures par voie IP et de 36 heures pour une prise orale (Bouteille *et al.*, 1999).

Cette expérience fut réitérée sur de nouvelles souris mais cette fois-ci avec la souche *T.b.brucei* AnTat 1.1E, responsable de la forme chronique de la maladie avec invasion du SNC à partir du 21^{ème} jour après inoculation entraînant la mort des animaux entre 26 et 37 jours post infection. Les souris ont été traitées par une injection unique en IP d'une dose de Suramine à 20 mg/kg. Les souris sont alors indemnes de parasites, mais cela de manière transitoire. En effet la Suramine va permettre d'éliminer les parasites circulants du sang périphérique mais sans atteindre le SNC, ce qui engendre le retour 11 à 43 jours plus tard des parasites dans le sang (Bouteille *et al.*, 1999). Une étude des tissus cérébraux des souris à la suite de cette rechute montrent des infiltrats lymphocytaires situés autour des vaisseaux sanguins du parenchyme. Effectivement, l'aparasitémie transitoire n'est que périphérique, les parasites sont alors toujours présents dans les plexus choroïdes de l'animal, où ils se multiplient (Jennings *et al.*, 1979, 1983). De cette manière et avec ce traitement par Suramine, les animaux peuvent être maintenus dans un cycle rechute/traitements (2 à 4 en moyenne)/aparasitémie périphérique transitoire jusqu'à 100 jours, date à laquelle l'atteinte cérébrale est trop grave, le nombre de parasites dans le LCR trop important, ce qui entraîne une rechute certes, mais également des signes neurologiques telles une perte d'équilibre, des convulsions, des altérations de la fonction motrice, des paralysies, une somnolence ainsi qu'une perte de poids (Pentreath *et al.*, 1994). L'examen du tissu cérébral indique une progression allant de simples lésions inflammatoires à une méningite voire une méningo-encéphalite. Ces atteintes évoluant des espaces périvasculaires, aux parenchymes cérébraux et cérébelleux, entraînent un emprisonnement des

trypanosomes dans le SNC, au niveau des plexus choroïdes, des méninges et des divers parenchymes (Keita *et al.*, 1997).

Une nouvelle étude a donc été menée avec utilisation cette fois, d'une bithérapie Suramine/Mégazol sur des souris infectées par la souche *T.b.brucei* AnTat 1.1E.

Suivant le schéma de Bouteille en 1995, une injection unique en IP de Suramine à 20 mg/kg au 21^{ème} jour est donnée, suivi d'une administration IP ou *per os* de Mégazol à 80 mg/kg une fois par jour durant 3 jours. Le suivi parasitémique indique que les parasites disparus, ne réapparaissent pas même au bout de 4 mois (délai de rechute normal pour cette souche) (Bouteille *et al.*, 1995). Il est donc possible de parler de guérison pour ces souris.

Un autre test a été réalisé, avec des souris infectées par *T.b.brucei* AnTat 1.1E, et traitées par plusieurs doses de Suramine à 20mg/kg afin de les maintenir dans le cycle rechute/traitement, afin de n'avoir des parasites qu'au niveau cérébral. Au jour 100 post infection, les souris ne présentant que des parasites dans le SNC, ont été traitées par une première injection de Suramine à 20 mg/kg, puis les 4 jours suivants par une administration *per os* de Mégazol à 80 mg/kg. L'observation faite est claire, en moins d'une semaine, les rongeurs présentent une amélioration notable de leur état général avec mobilité et reprise normal de l'alimentation. De plus, un suivi de l'encéphale effectué à 7, 14 jours puis 1, 2, 4 et 6 mois post traitement montre que dès le deuxième mois, il n'y a plus de lésions inflammatoires (Enanga *et al.*, 1998).

Après observation de ces résultats sur modèle murin, des chercheurs ont voulu approfondir l'étude en effectuant des tests à partir de la souche *T.b.gambiense* MBA ITMAP 1811 sur des singes verts, des cercopithèques (*Chlorocebus aethiops*) (Ouwe-Missi-Oukem-Boyer *et al.*, 2006). Après inoculation du parasite aux singes, une partie diagnostiquée au stade lymphatico-sanguin, a été traitée par une dose unique de Mégazol à 100 mg/kg *per os*, l'autre partie présentant des signes cliniques neurologiques et des trypanosomes dans le LCR a été traitée par dose unique de Mégazol 100 mg/kg *per os* suivi d'une dose de Suramine 20 mg/kg en IV. Le suivi a conduit à une observation deux ans après d'absence de rechute chez l'ensemble des singes (Enanga *et al.*, 2000 ; Chauvière *et al.*, 2003).

En 2012, en respectant le protocole d'étude d'Enanga, des chercheurs ont tenté de déterminer la dose minimale efficace de Mégazol. Pour cela, le modèle murin infecté par la souche *T.b.brucei* AnTat 1.1E a été utilisé, permettant d'avoir une infection chronique avec atteinte cérébrale aux alentours du 21^{ème} jour. Le schéma thérapeutique d'Enanga en 1998 fut respecté. Une dose de Suramine à 20 mg/kg au 21^{ème} jour post infection suivi de 3 ou 4 administrations

per os de Mégazol à des doses croissantes allant de 10 à 80 mg/kg en fonction des groupes de souris établis (Enanga *et al.*, 1998) . Ceci a permis de visualiser qu'à 80 mg/kg l'ensemble des souris survivaient alors qu'à la dose de 10 mg/kg, elles décédaient. La dose minimale efficace se situe donc entre 40 et 60 mg/kg d'après les résultats (Mespoulet, 2012). De plus, cette étude a permis de visualiser les métabolites du Mégazol recueillis dans les urines et le plasma afin par la suite d'envisager des études dessus.

9.4.2. Mode d'action

Son activité biologique est liée à la réduction du groupement nitro (R-NO₂) en radical anion évoluant par la suite vers une forme nitroso (R-NO) en milieu anaérobie, et donnant des dérivés du stress oxydatif et des radicaux libres en milieu aérobie (Edwards *et al.*, 1993). A noter, que la situation en anaérobiose correspond à la forme intracellulaire du trypanosome, alors que la situation aérobie s'apparente à sa forme dans la circulation sanguine (Bouteille *et al.*, 1999). Tout cela interfère alors avec le métabolisme de l'oxygène du parasite (Viode *et al.*, 1999).

En 1997, Viode *et al.*, s'intéressent au radical anion et à son éventuel potentiel rédox. Par une étude en radiolyse pulsée, il a été montré qu'il possédait un faible potentiel rédox à -430 mV qui défavorise sa bioréduction normale. De plus en comparant les données avec celles obtenues avec le Nifurtimox et le Métronidazole, il a été constaté que les vitesses de dismutation et la vitesse de réaction sur l'anion superoxyde étaient bien plus rapides dans le cas du Mégazol. Ces réactions conduisant à la formation du nitroso-imidazole, il a été suggéré que le Mégazol agissait essentiellement comme un piège à thiols intracellulaires par son intermédiaire métabolique. (Viode *et al.*, 1997).

De plus la formation de l'intermédiaire nitroso provoque la capture de thiols intracellulaires, entraînant un effet létal sur les parasites. Ces thiols ont un rôle important dans la régénération du NADH, du NADPH, dans la saisie des radicaux libres, et dans la détoxification de la cellule. Pour illustrer cela, en 2003, Maya *et al.* ont démontré l'action du Mégazol sur le thiols. En effet, ils ont testé divers composés portant des groupements -nitro pour juger de leur action sur *T.cruzi*. Le résultat a montré que l'ensemble de molécules agissaient en formant un cycle par réaction d'oxydoréduction, mais que le plus actif était le Mégazol, qui lui agissait en piégeant les groupements thiols dont ceux de la Trypanothione (Maya *et al.*, 2003).

Les trypanosomes sont sensibles au stress oxydatif du fait de l'absence de catalase, de glutathione peroxydase et de molécules anti-oxydantes (Docampo *et al.*, 1976, 1981 ; Boveris

et al., 1980 ; Morello *et al.*, 1988). Ils possèdent, néanmoins, une enzyme la Trypanothione réductase, essentielle au processus de détoxification du parasite (Krauth-Siegel *et al.*, 1987). Un grand nombre d'inhibiteurs de cette enzyme furent découverts , sans réellement présenter d'activité satisfaisante lors de tests *in vivo* à l'encontre des parasites (Henderson *et al.*, 1988 ; Girault *et al.*, 1997 ; Walton *et al.*, 2011 ; Patterson *et al.*, 2011). Concernant le Mégazol, il ne possède aucune activité à l'encontre de cette enzyme (Viode *et al.*, 1999 ; Krauth-Siegel *et al.*, 1995).

Le Mégazol a également été testé comme inhibiteur de la Super Oxyde Dismutase (SOD) du parasite intervenant dans le métabolisme de l'oxygène. Il faut savoir que la SOD humaine et celle du trypanosome diffèrent fortement dans leurs structures ainsi que dans la nature du métal présent dans le site actif. En effet, chez l'Homme, on retrouve le Cu-Zn, alors que pour le parasite il y a le Fe (Le Trant *et al.*, 1983).

Une dernière approche, concerne le transporteur d'adénosine P2 utilisé par le parasite et reconnaissant le motif N=C-NH₂ retrouvé sur le Mégazol (tout comme les aminopurines et l'oxyde de Melarsen), a montré la capacité d'internalisation cellulaire de la molécule par le parasite (Carter *et al.*, 1995 ; Barrett *et al.*, 2000). Toutefois, la présence du Mégazol au niveau intracellulaire se fait majoritairement par simple diffusion passive, ceci impliquerait donc, que là où il y a une résistance au mélarsoprol, et autres diamines, par mutation de souches n'exprimant plus ou très peu ce transporteur P2, le Mégazol continuerait d'être actif par ce double passage (Barrett *et al.*, 2000).

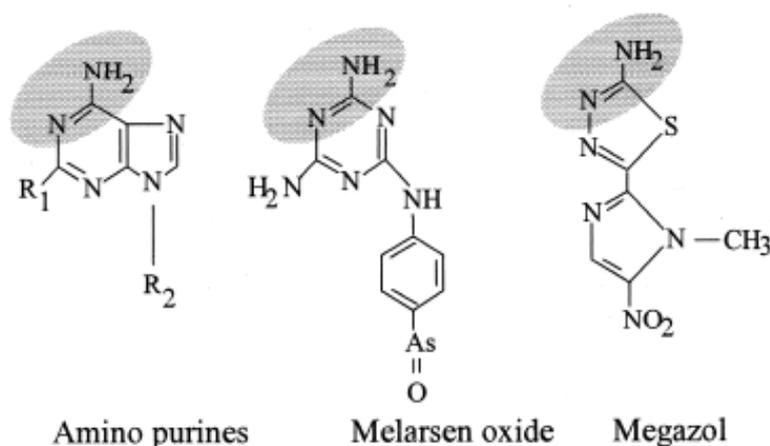


Figure 14. Structure similaire entre le Mégazol, l'oxyde de Mélarsen et les aminopurines.

Une autre étude a permis de signer l'intérêt du Mégazol comme étant le meilleur inhibiteur de la fumarate réductase (enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale du parasite) (Turrens *et al.*, 1996). Cette enzyme intervient dans le remplacement de l'oxygène par le fumarate. Le Mégazol jouerait un rôle important dans l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale du parasite par action sur la fumarate réductase, ce qui constituerait sa plus grande toxicité à l'encontre du trypanosome. De plus, sa capacité à engendrer un stress oxydatif et à générer des intermédiaires nitroso utilisant les thiols intracellulaires, augmenterait d'autant plus sa toxicité pour le parasite (Bouteille *et al.*, 1999).

9.4.3. Pharmacocinétique

Les premières études menées sur la pharmacocinétique du Mégazol ont débuté en 1997, avec les travaux de Enanga *et al.*, par une mise au point d'une technique de dosage par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance), permettant une détection dans les fluides biologiques. Cette technique a permis une détection à partir de 2 ng/mL, avec un temps de rétention de 9,60 minutes (Enanga *et al.*, 1997).

Par la suite, des études *in vivo* ont exposé les premiers résultats sur la pharmacocinétiques, le métabolisme et l'excrétion du Mégazol. En effet, après administration d'une dose de 80 mg/kg chez des souris saines, il a été démontré que le meilleur pic plasmatique s'obtenait à la suite d'une prise *per os* (33,8 µg/mL), et ceci comparativement, à une injection IP (19,0 µg/mL). De plus, cette même étude a permis de montrer qu'une administration de Suramine préalable de 24 heures de 20 mg/kg améliorait la vitesse d'absorption digestive du Mégazol (Tmax de 4 heures après Suramine *versus* 2 heures sans Suramine), mais diminuait sa concentration plasmatique (19,9 µg/mL *versus* 33,8 µg/mL). Un autre point fut apporté, cette fois-ci sur des souris parasitées par une souche *T.b.brucei* AnTat 1.1E, où après injection IP de Suramine, le volume apparent de distribution augmentait (5,6 L/kg *versus* 0,9 L/kg), avec un allongement du temps de demi-vie du Mégazol (3 heures *versus* 0,7 heure). Durant cette même étude, il a été constaté que l'élimination de la molécule se faisait majoritairement par voie urinaire (80 % *versus* 10,5 % dans les fèces et 9,5 % encore dans le corps) et cela en l'excrétant de manière non métabolisée (Enanga *et al.*, 1999).

Une autre étude, toujours menée par Enanga *et al.*, en 2000, cette fois-ci sur des singes verts cercopithèques infectés par la souche MBA IT-MAP 1811 de *T.b.gambiense*, a montré qu'après administration *per os* de Mégazol à 100 mg/kg, il y a une diminution de la quantité de Mégazol éliminé, mais qu'il y a une accélération de l'absorption du Mégazol chez des primates avec une

infection prolongée. De plus, après analyse du taux de Mégazol dans le LCR, il a été démontré que ce taux variait de 5,2 à 10,5 % de la concentration plasmatique, et que la demi-vie oscillait entre 2,7 et 2,89 heures (Enanga *et al.*, 2000).

9.4.4. Tolérance et Toxicité

En 1968, Berkelhammer et Asato, deux chimistes d'American Cyanamid Co, ont découvert le Mégazol (précédemment nommé CL64855). Dès cette découverte, de nombreuses travaux sont apparus sur cette molécule afin d'étudier sa tolérance, ses effets et sa toxicité. Pour cela, des tests ont été menés *in vitro*, et *in vivo* sur différents animaux (souris, rats, hamsters, poussins et porcinés) infectés de pathogènes bactériens ou parasitaires de tout type. Ainsi, Redin *et al.*, ont déterminé la bonne tolérance de la molécule sur souris en indiquant la dose létale 50 à 1400 mg/kg (Redin *et al.*, 1968). De même, Burden *et al.*, exposent le fait que le Mégazol est deux fois plus puissant que le Métronidazole, mais qu'à une concentration plus importante il devient toxique et entraîne une réduction de l'appétit avec une perte de poids de 17 % (Burden *et al.*, 1968). Dans le même temps, sur modèle porcin, Layton *et al.*, montrent l'intérêt de cette molécule, ainsi que son efficacité en signalant qu'aucun des porcelets traités n'a exprimé de modification de la masse (Layton *et al.*, 1968).

Bien plus récemment, Bouteille *et al.*, en 1999, à la suite de tests sur souris et singes, dévoilent une absence d'intolérance à la molécule pour les animaux et ceci trois mois post traitement (Bouteille *et al.*, 1999).

9.4.5. Mutagénicité

L'étude de la mutagénicité est apparue dans les années 70 avec l'équipe d'Ames B. En effet, le principe de ce test repose sur l'utilisation d'une souche de *Salmonella* dites auxotrophe, n'ayant pas la capacité de transformer l'histidine par mutations de leurs gènes. Or, cette absence d'histidine, essentielle à leur survie, entraîne la mort des bactéries. Ainsi, lors du contact de ces souches avec une molécule, qui induit la capacité de pousser des bactéries dans un milieu minimum, sans histidine, et donc la survie des bactéries, on conclue que la molécule est mutagène. De plus, il peut être réalisé un test avec du 'S9 mix' (extrait de foie de rat), qui permet de mimer le métabolisme hépatique et de visualiser la possible mutagénicité des métabolites (Ames *et al.*, 1975).

Grace à ce test, il a pu ainsi être démontré que des composés nitrés tels le Nifurtimox et le Benznidazole, possédaient une activité mutagène (Ferreira *et al.*, 1986, 1988).

Concernant le Mégazol, des tests ont été réalisés *in vitro* avec différentes souches de *Salmonella* (TA 98, TA 100 TA 102) dont seulement deux avaient muté (TA 98, TA 102), puis la même expérience a été réitérée, cette fois-ci avec trois autres souches de salmonelles (TA 98, TA 98dnp₆, TA 98nr qui ne possédant pas de nitro-réductase), dont deux (TA 98, et TA 98dnp₆) ont été mises en contact avec les échantillons sériques, et ont muté que ce soit *in vitro* et *in vivo*, sans mutation de la souche TA 98nr après ajout de foie. Toutefois, il fut noté que les souches présentaient une mutagénicité dans les urines, laissant supposer une autre voie de métabolisation que le foie (De Morais *et al.*, 1998 ; Ferreira *et al.*, 1988).

De plus, concernant la souche sans nitro-réductase et ne présentant pas de mutagénicité, une explication a été donnée par Watanabe en 1998. Effectivement, une nitro-réductase classique est une flavoprotéine catalysant la réduction de la fonction nitro présente sur les cycles aromatiques afin de donner des métabolites toxiques, mutagènes voire cancérigènes, ainsi la souche ne possédant pas cette nitro-réductase n'est pas capable de catalyser la réduction de la fonction nitro du Mégazol, et ne peut conduire à des composés toxiques ou mutagènes. (Watanabe *et al.*, 1998).

En 2002, Poli *et al.*, mènent une étude afin de démontrer la géno-cyto-toxicité du Mégazol lors de son administration concomitante avec la Bléomycine. Toutefois, il a été noté que cette toxicité était durée dépendante. En effet, le taux d'ADN lésé était plus important lors d'un traitement court entre 1 et 4 heures, que lors d'un traitement long de 20 à 40 heures. Ceci laisse suggérer un mécanisme de réparation du matériel génétique lésé (Poli *et al.*, 2002). De plus, durant la même analyse, il a été vu une cytotoxicité chez une levure dépourvu de cytochrome P450, absence chez elles possédant ce cytochrome.

A ce jour, les dernières études de mutagénicité ont été réalisées par Nesslany *et al.*, en 2004, et ont montré le potentiel génotoxique et clastogène du Mégazol (Nesslany *et al.*, 2004).

9.4.6. A la recherche d'un composé atoxique

Ainsi, à la suite de ces différents tests, le Mégazol a vu son développement stoppé, alors que l'étude effectuée par Nesslany pour prouver cette toxicité s'est basée sur des doses 30 fois supérieures à la dose efficace démontrée par Enanga en 2000, ce qui n'a pas grand intérêt si la mutagénicité n'est pas testée à la dose thérapeutique.

Pour pallier à cela, des modification structurales du Mégazol ont été proposées afin d'optimiser son activité thérapeutique et en ayant le moins de toxicité possible. Pour cela, différents substituants ont été ajoutés à la structure mère, mais sans résultat probant, car en effet dès atteinte à la structure mère, le Mégazol perd de son activité (Bouteille *et al.*, 1999).

Il a donc été évident de se pencher sur les métabolites stricts du Mégazol afin de les étudier et d'en comprendre leur activité.

10. Objectifs

L'objectif premier est d'étudier l'effet trypanocide du Mégazol, avec pour objectifs secondaires la recherche de la dose minimale efficace *in vivo*, l'étude de la stabilité métabolique de cette molécule *ex vivo* sur des hépatocytes murins et humains, et l'identification des métabolites secondaires.

II. Etude expérimentale

1. Matériels et méthodes

Matériels et souches utilisés

- Trypanosomes

Dans ce travail nous avons utilisé la souche *T.b.brucei* AnTat 1.1E P14 (ITMAS 150115), fournie par l'Institut de médecine tropicale d'Anvers (Belgique).

- Molécules

Le **Mégazol marqué**, a été synthétisé et fourni par le Dr MORVAN (FlowChem, Mazères, France). La synthèse de cette molécule est confidentielle, toutefois certaines étapes sont publiées dans la littérature. Le marquage de la molécule se fait avec du ^{13}C au niveau du carbone 5 du cycle thiadiazole.

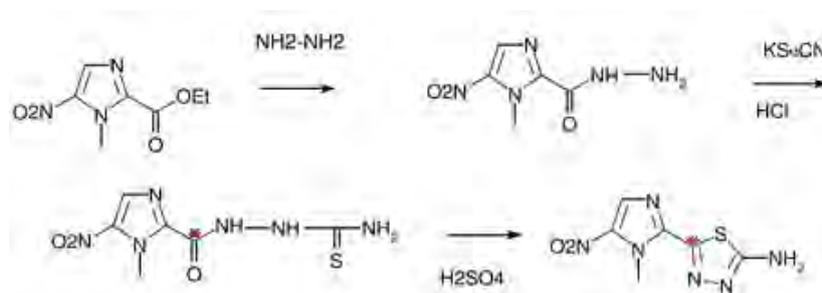


Figure 15. Synthèse du Mégazol

1.1. Expérimentation *in vivo*

1.1.1. Matériels

• Souris

Il s'agit de souris blanches (Swiss) âgées de 9 semaines, d'une masse moyenne lors de l'infection de 34,1 g, issues du laboratoire Janvier-Labs (St Berthevin, France).

Durant l'étude, elles ont été hébergées à l'animalerie de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Limoges, dans le respect des conditions de vie nécessaires.

Toutes les manipulations ont été effectuées en conformité avec les recommandations nationales et internationales actuelles sur l'expérimentation animale. Le dossier a été déposé auprès du responsable de l'animalerie qui l'a transmis aux instances du ministère chargées de l'expertise.

Deux études ont été menées. Une première reprenant les travaux de Mespoulet en 2012, une deuxième affinant les doses pour avoir une gamme de concentrations plus étendue et détaillée.

Etude 1 : 8 groupes aléatoires de 10 souris formés pour constituer notre étude sur le Mégazol marqué.

- ❖ Groupe 1 traité par 60 mg/kg/jour (3 jours)
- ❖ Groupe 2 traité par 50 mg/kg/jour (3 jours)
- ❖ Groupe 3 traité par 40 mg/kg/jour (3 jours)
- ❖ Groupe 4 traité par 30 mg/kg/jour (4 jours)
- ❖ Groupe 5 traité par 20 mg/kg/jour (4 jours)
- ❖ Groupe 6 sont des témoins infectés, traités par 20 mg/kg de Suramine (1 jour)
- ❖ Groupe 7 sont des souris témoins infectés, et non traités
- ❖ Groupe 8 sont des témoins non infectés, non traités

Etude 2 : 6 groupes aléatoires de 18 souris pour les lots traités et de 8 souris pour les lots témoins

- ❖ Groupe A traité par 55 mg/kg/jour (3 jours)
- ❖ Groupe B traité par 45 mg/kg/jour (3 jours)
- ❖ Groupe C traité par 35 mg/kg/jour (3 jours)
- ❖ Groupe D traité par 30 mg/kg/jour (3 jours)
- ❖ Groupe E sont des témoins infectés, traités par 20 mg/kg de Suramine (1 jour)
- ❖ Groupe F sont des témoins infectés, non traités

- molécules thérapeutiques utilisées
- **Suramine** (Sigma Aldrich, USA). Elle a été solubilisée dans une solution physiologique avant d'être injectée aux souris en intra péritonéale (IP) dans un volume de 200 µL. Ceci permet d'éliminer les parasites présents au niveau périphérique, seul survivront les parasites présents au niveau du SNC, là où la suramine ne peut les atteindre.
- **Mégazol marqué** (Dr Morvan). Il se présente sous forme de poudre jaune non soluble dans l'eau, mais soluble dans le DMSO. Il a été mélangé à une suspension de

CarboxyMethylCellulose (CMC) (Merck, Germany) de viscosité 2%, avant d'être administré aux souris *per os* à l'aide d'une sonde de gavage à hauteur de 50 µL.

1.1.2. Méthodes

- Infestation

La souche parasitaire a été décongelée et portée à 37°C puis a été injectée à des souris en IP. Ce premier passage a permis le développement et l'adaptation du parasite. Par la suite, les trypanosomes ont été comptés à partir d'une goutte de sang de ces souris sur cellule de Malassez, pour être dilués dans une solution de NaCl 0,9% avant d'être injectés en IP aux souris de l'étude à la concentration de 500-1000 trypanosomes dans 200 µL.

- Protocole thérapeutique

Le Mégazol marqué sera utilisé suivant les résultats obtenus par Enanga *et al.* en 1998 et 1999, concernant la pharmacocinétique de la molécule, afin d'avoir la meilleure activité possible. Il est associé à une administration préalable de Suramine par voie IP selon le schéma suivant (Enanga *et al.*, 1998, 1999).

	J-15	J1	J21	J22	J23	J24	J25
Groupe 1	Arrivée	Infection	Suramine	Mégazol	Mégazol	Mégazol	-
Groupe2	Arrivée	Infection	Suramine	Mégazol	Mégazol	Mégazol	-
Groupe3	Arrivée	Infection	Suramine	Mégazol	Mégazol	Mégazol	-
Groupe4	Arrivée	Infection	Suramine	Mégazol	Mégazol	Mégazol	Mégazol
Groupe 5	Arrivée	Infection	Suramine	Mégazol	Mégazol	Mégazol	Mégazol
Groupe 6	Arrivée	Infection	Suramine	CMC	CMC	CMC	CMC
Groupe 7	Arrivée	Infection	-	-	-	-	-
Groupe 8	Arrivée	-	-	-	-	-	-

Tableau 2. Protocole de traitement des souris par groupes (étude 1).

	J-15	J1	J21	J22	J23	J24
Groupe A	Arrivée	Infection	Suramine	Mégazol	Mégazol	Mégazol
Groupe B	Arrivée	Infection	Suramine	Mégazol	Mégazol	Mégazol
Groupe C	Arrivée	Infection	Suramine	Mégazol	Mégazol	Mégazol
Groupe D	Arrivée	Infection	Suramine	Mégazol	Mégazol	Mégazol
Groupe E	Arrivée	Infection	Suramine	CMC	CMC	CMC
Groupe F	Arrivée	Infection	-	-	-	-

Tableau 3. Protocole de traitement des souris par groupes (étude 2).

Le traitement débute au 21^{ème} jour post-infection, ce qui correspond au temps moyen de passage du parasite au travers de la BHE (Bouteille *et al.*, 1995).

Le protocole thérapeutique débute par une administration IP de 200 µL de Suramine à 20 mg/kg le 21^{ème} jour post infection.

Dès le jour suivant à la même heure, on administre 50 µL *per os* de Mégazol marqué aux doses correspondantes pour chaque groupe de souris. Cette dernière administration est répétée 3 ou 4 fois selon les groupes.

Le terme de l'étude est fixé à 7 mois post traitement.

- Prélèvements et recueil des données

Pour déterminer les heures de prélèvement des urines nous avons utilisé l'étude pharmacocinétique d'Enanga *et al.*, en 1999.

Les prélèvements de sang ont été effectués 1h après la première et la dernière administration de Mégazol de chaque lot. Ce prélèvement sanguin s'effectue par ponction du sinus rétro-orbital des souris. Une fois le sang récupéré il est centrifugé afin de récupérer le sérum.

Pour les urines, les prélèvements sont réalisés 3h après la première dose, sur une durée de prélèvement de 12h ; puis sur une durée de 24h, pour la dernière dose. Ces prélèvements ont été obtenus grâce à des cages à métabolisme (Tecniplast®, Italie).

La masse des souris a été mesurée chaque semaine, et la charge parasitaire a été déterminée sur cellule de Malassez 2 jours post-infection puis tous les 7 jours durant les mois d'étude

- Etude des métabolites

L'extraction est réalisée à partir de 100 µL d'urine et 100 µL de sérum, déposés dans un tube Falcon hermétique, auquel on ajoute dans un premier temps du Métronidazole (Sigma Aldrich) utilisé comme étalon interne (quantité identique pour chaque série de prélèvements). Par la suite, 20 µL de NaOH 1N sont ajoutés. Le tout est vortexé avant un repos de 5 min. Puis, 5 mL du solvant d'extraction, le butan-2-ol, sont ajoutés. Ce nouveau mélange est mis sous agitation rotatoire à 25 rpm durant 20 min, puis centrifugé à 3500 rpm pendant 10 min. A la sortie de la centrifugeuse, nous obtenons un liquide homogène constituant l'extrait alcalin qui est récupéré dans un tube Falcon, et un précipité. A ce précipité, sont ajoutés 65 µL d'HCl 1N. L'ensemble est vortexé puis laissé au repos 5 min. Puis, 5 mL de butan-2-ol lui sont ajoutés, sous agitation rotatoire durant 20 min avant de subir une centrifugation pendant 10 min. La partie non précipitée est récupérée et correspond à l'extrait acide. Les deux extraits acide et alcalin sont alors mélangés, et mis à évaporation au Speed-Vac afin d'obtenir des extraits secs, qui seront reconstitués dans 100 µL de 50:50:0,1 de méthanol/eau/acide acétique (CH₃COOH), vortexés, soniqués puis centrifugés avant l'analyse HPLC/MS.

- Analyses HPLC/MS

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

Les paramètres d'ionisation ont été optimisés en infusant une solution de Mégazol et de Mégazol marqué à 10 µg/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 pour le mégazol et 81 V pour le mégazol marqué
- Gaz de collision : azote

→ Méthode GUS

La méthode GUS ou General Unknown Screening, consiste à détecter et identifier sans *a priori*, les composés présents dans les matrices biologiques. Il faut ensuite déterminer lesquelles de ces molécules sont réellement intéressantes parmi celles ressortant du bruit de fond (Sauvage *et al.*, 2006).

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 MS sont sélectionnés comme ions parents (sans autres critères de sélection), et sont fragmentés en EPI (Collision Energy (CE), 35 V ; Collision Energy Spread (CES), 15 V) pour obtenir les spectres de fragmentation spécifiques à chaque molécule sélectionnée (ensemble des « ions fragments »). Chaque ion peut être sélectionné pour un maximum de 2 occurrences consécutives, il est ensuite exclu pendant 10 secondes. Cette exclusion a pour but de limiter la sélection des ions majoritaires et de descendre en sensibilité.

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 60 mg/kg de Mégazol marqué. Les ions présents uniquement dans l'extrait 60 mg/kg sont sélectionnés en tant que métabolites potentiels et intégrés dans la méthode MRM.

→ 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). A partir des résultats d'analyses préalables par la méthode GUS, ce protocole analytique consiste à faire le

choix d'une sélection d'« ions fragments » spécifiquement retrouvés dans le profil de fragmentation de chaque « ion précurseur » d'intérêt.

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 DP
- Le CXP
- La CE

Parmi tous ces paramètres, seule varie l'énergie de collision appliquée pour leur fragmentation, à chaque ion parent. Les paramètres du Mégazol, du Mégazol marqué 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 V, sauf pour certaines transitions peu intenses qui nécessitaient une énergie de collision à 50 V.

Contrairement à la méthode mise en place au cours des analyses de Mespoulet, qui faisait intervenir un temps de scan identique pour chaque transition (25ms), la méthode mise en place au cours de cette thèse est de type Scheduled MRM : un temps de rétention est défini pour chaque molécule cible avec une fenêtre de ± 2 min. Le spectromètre de masse adapte le temps de scan en fonction du nombre de transitions qu'il doit suivre à chaque temps t . Les transitions étant assez bien réparties au cours du temps, cette méthode permet d'obtenir des pics plus intenses et mieux définis.

Le volume d'injection est de 3 μl et 20 μl pour les extraits d'urines et de plasma respectivement. Une méthode d'interprétation des spectres a été définie pour automatiser la détection et le calcul de l'aire de chaque pic d'intérêt. Après validation manuelle de l'intégration de chaque pic, les valeurs d'aires sont ensuite normalisées par rapport à l'aire du pic de la transition 172 \rightarrow 128 du Métronidazole.

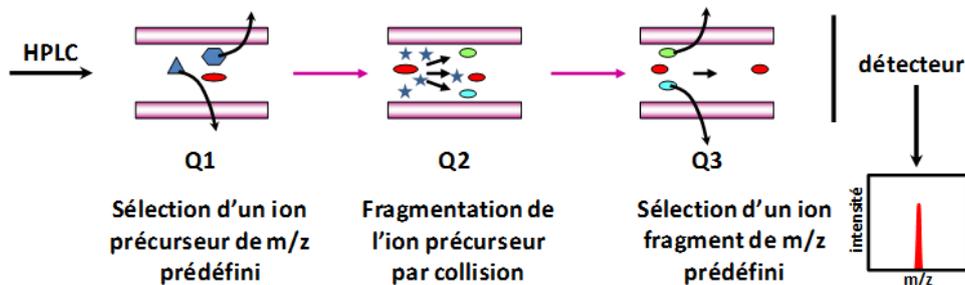


Figure 16. Illustration du principe de MRM (www.cgfb.u-bordeaux2.fr)

→ Méthode MTS

Une méthode de « *Multi-Target-Screening* » ou MTS a été mise en place pour acquérir l'ensemble des spectres de fragmentation des métabolites ciblés par la méthode Scheduled MRM. Brièvement, cette méthode associe la spécificité de la MRM en sélectionnant pour la fragmentation les seuls ions d'intérêt. Un spectre MS/MS ne sera acquis que si les masses détectées (précurseur en Q1 et fragments en Q3) appartiennent aux transitions enregistrées dans la méthode MRM.

1.2. Expérimentation *ex vivo*

1.2.1. Matériel

- Microsomes hépatiques

Les microsomes hépatiques humains ont été fournis par l'équipe UMR INSERM 850. La concentration du pool de 8 foies humains était de 35 mg/mL.

Les microsomes hépatiques murins ont été obtenus après sacrifice d'une souris de notre équipe. Ils ont été préparés avec l'équipe UMR INSERM 850. La concentration était de 21,3 mg/mL.

Lors de l'étude, les concentrations des microsomes étaient de 0,5 mg/mL. Ils ont été dilués dans du tampon TRIS.

Une première manipulation a été effectuée avec les microsomes humains, puis une autre avec les murins.

- Milieu

- Tampon d'incubation : TRIS-HCl, MgCl₂ (pH 7,4 à 37°C).
- Co-substrat : NADPH (4 mM) (dans du tampon TRIS)
- Substrat : Mégazol non marqué (0,5 mM) (dans du DMSO à 1%)
- Solution STOP : Acétonitrile et Métronidazole (étalon interne)

1.2.2. Méthodes

La réaction consiste à mettre en solution dans un volume final de 500 µL, le substrat avec le NADPH. Après homogénéisation, le mélange est placé au bain-marie à 37°C, les microsomes sont ajoutés ensuite. Ainsi la réaction commence.

Le mélange réactionnel est mis à incuber 30 min à 37°C, en prélevant 50 µL de chaque tube à différents temps (T0, T5, T10, T15, T20 et T30) afin de suivre l'évolution de la métabolisation. Les réactions sont arrêtées par l'ajout de 50 µL de solution d'Acétonitrile. Les échantillons sont alors centrifugés durant 5 min à 13 000 rpm, le surnageant est récupéré et analysé directement en HPLC/ MS.

La réaction est faite en duplicat, avec trois témoins différents.

<u>TUBE 1</u>	<u>TUBE 2</u>	<u>TUBE 3</u>	<u>TUBE 4</u>	<u>TUBE 5</u>
Mégazol Microsomes NADPH	Mégazol Microsomes NADPH	DMSO Microsomes NADPH	Mégazol Microsomes Tampon TRIS	Mégazol Tampon TRIS NADPH

Tableau 4. Plan de manipulation avec les microsomes

1.3. Identification et synthèse des métabolites

Afin d'étudier l'activité de certains métabolites identifiés lors de l'étude *in vivo*, notre équipe a fait appel au laboratoire, Alpha Chimica, dont le but est de développer des procédés innovants pour la synthèse des métabolites de phase 1 de xénobiotiques.

Leur objectif est de réaliser l'oxydation du Mégazol par catalyse biomimétique afin de produire les métabolites majoritaires de ce composé. Ceci pour que nous puissions poursuivre avec une étude *in vitro* mesurant leur DL50.

Le procédé développé par Alpha Chimica, consiste à synthétiser *in vitro* et en grande quantité les métabolites de xénobiotiques à l'aide de catalyseurs. Les catalyseurs produits mimant une partie des activités des cytochromes P450 les plus impliqués dans le métabolisme des médicaments.



Figure 17. Technologie utilisée par Alpha Chimica
(fourni par Alpha Chimica)

Ces catalyseurs biomimétiques, reproduisent en partie ou en totalité le phénomène métabolique naturel et aident à la préparation rapide des métabolites, ceci en quantité plus importante en comparaison avec les microsomes hépatiques ou de microchampignons.

Le laboratoire, après plusieurs tests tenus confidentiels, a choisi d'utiliser des systèmes catalytiques capables de réaliser les différentes activités observées pour la transformation du Mégazol, à savoir la *N*-déméthylation, l'hydroxylation et la sulfoxydation.

L'oxydation biomimétique du Mégazol a été effectuée à l'aide de trois systèmes catalytiques symbolisés AC001, AC002 et AC003.

Pour chaque réaction 10 mg de Mégazol ont été utilisés, en présence de catalyseurs et d'un oxydant, le tout dans un mélange de solvants. Les réactions se sont déroulées sur une période de 48 heures à température ambiante (20°C) et à 40°C. Les prélèvements ont été effectués à 2h et 24h après puis analysés en HPLC/MS.

2. Résultats

2.1. Expérimentation *in vivo*

- Résultats généraux sur les tests murins

L'évaluation de la parasitémie des lots de souris a été mesurée 2 jours post-infection puis toutes les semaines afin d'avoir un suivi régulier du taux de parasites présents chez toutes les souris. De plus, ces mesures nous ont permis de vérifier l'infestation réelle de l'ensemble des souris de chaque lot. L'ensemble des données est regroupé dans le tableau 5 mais également dans les figures 7 et 8.

Toutefois, sur l'ensemble des souris des deux études, des pertes expérimentales sont survenues. Au cours de l'étude 1, une souris est morte à la suite de l'injection IP de Suramine; pour l'étude 2, 4 souris sont mortes (trois suite à l'injection IP de Suramine, une suite au prélèvement de sang au niveau du sinus rétro-orbital, méthode invasive et délicate). Néanmoins, les souris mortes lors de l'injection IP de Suramine ont pu être remplacées à temps par des souris faisant parties des lots témoins infectés / non traités, ce qui a permis de maintenir un nombre équivalent dans les lots recevant le Mégazol. Toutes ces explications sont regroupées dans le tableau 5.

Par ailleurs, le poids des souris a été apprécié chaque semaine à la suite de l'infection. Une chute de la masse dès le début du traitement (J21) pour l'ensemble des lots traités est observée et ceci pour les deux études, alors que les témoins infectés / non traités et les témoins non infectés / non traités prenaient du poids. Cependant, après une semaine post-traitement, une augmentation de la masse moyenne des souris des lots traités était notée de manière similaire. Ces données sont représentées sur les figures 9 et 10.

Lot	Souris infectées	Souris réellement parasitées	Pertes expérimentales	Effectif exploitable	Rechute	Souris indemnes
60 mg/kg	10	10	0	10	ND	ND
55 mg/kg	18	18	0	18	ND	ND
50 mg/kg	10	10	0	10	ND	ND
45 mg/kg	18	18	1	17	ND	ND
40 mg/kg	10	10	0	10	ND	ND
35 mg/kg	18	18	0	18	ND	ND
30 mg/kg	10	10	0	10	ND	ND
30 mg/kg	18	18	0	18	ND	ND
20 mg/kg	10	10	0	10	ND	ND
T inf - Suramine	18	18	0	18	-	-
T inf - NT	18	18	4	14	-	-
T Ninf - NT	0	0	0	10	-	-

Tableau 5. Résultats généraux des deux études

(NT : non traités; T inf : témoins infectés; T Ninf, témoins non infectés;

ND : non déterminé)

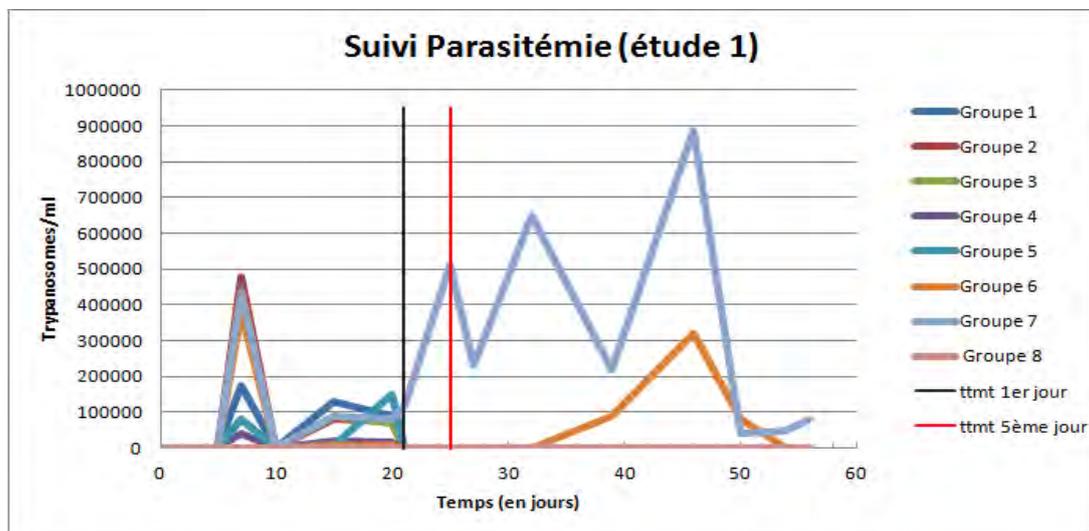


Figure 18. Suivi de la parasitémie moyenne par lot de souris pour l'étude 1

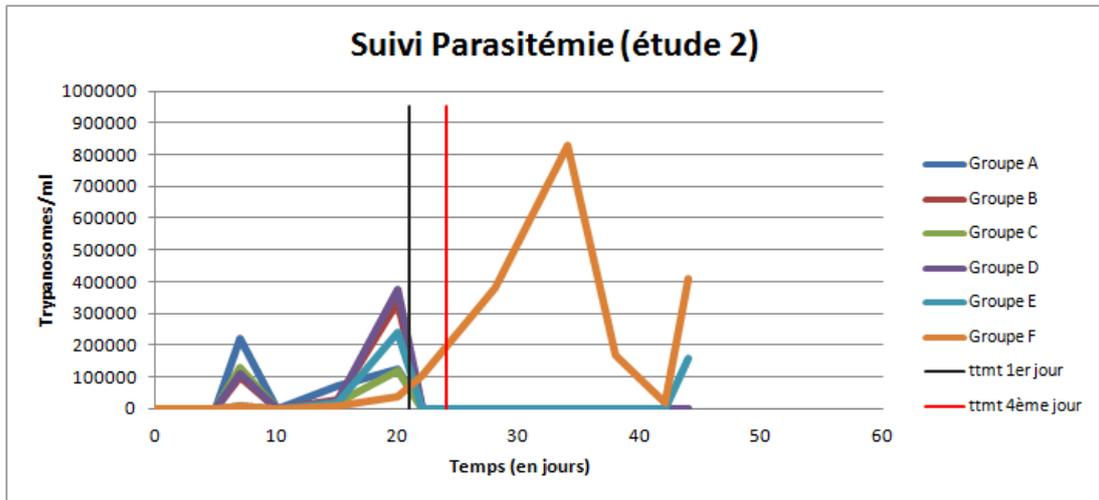


Figure 19. Suivi de la parasitémie moyenne par lot de souris pour l'étude 2

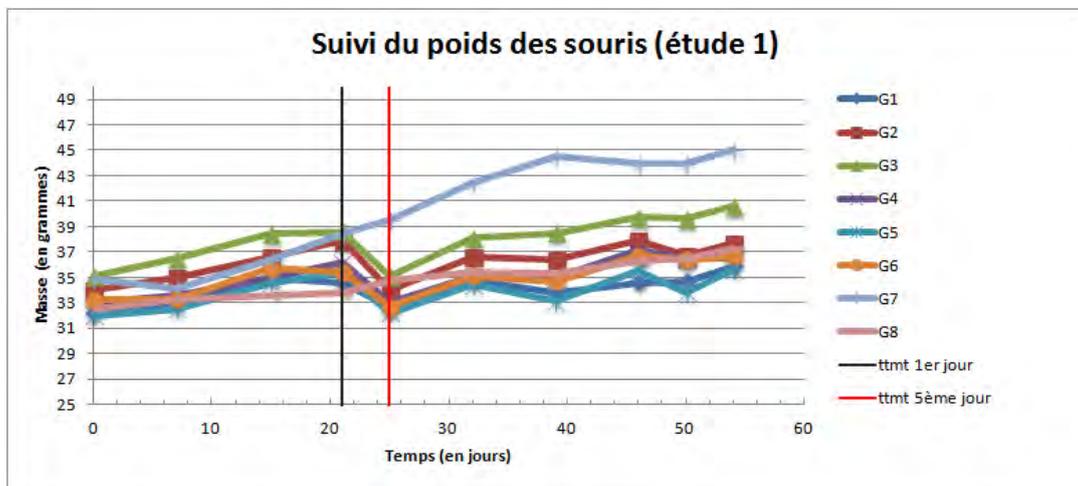


Figure 20. Suivi de la masse moyenne par lot de souris pour l'étude 1

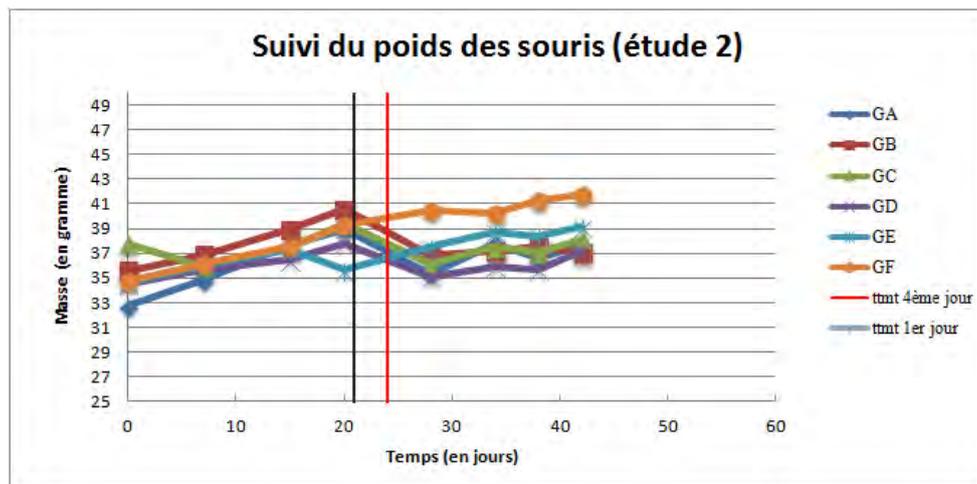


Figure 21. Suivi de la masse moyenne par lot de souris pour l'étude 2

Concernant les rechutes, nous observons que les groupes G6 et GE qui correspondent aux témoins infectés et traités uniquement avec de la Suramine, rechutent une vingtaine de jours post-traitement.

- Résultats sur la recherche des métabolites

- Méthode GUS

La détection des ions a été obtenue en comparant les urines des groupes G1 (60 mg/kg de Mégazol) et G6 (0 mg/kg de Mégazol), les deux extrêmes, afin d'avoir le maximum de chance de repérer les métabolites et de les extraire du bruit de fond. Ainsi, il a pu être obtenu 17 ions différents dont le Mégazol. Parmi eux, 14 en comptant le Mégazol, ont déjà été observés lors des précédents travaux. Certains sont apparus avec les mêmes temps de rétention, des profils identiques et des variations de masses correspondantes augmentées de +1 (dues au marquage du Mégazol en ¹³C) par rapport à ceux analysés en 2012. La présence de ces molécules avec des spectres de fragmentation similaires à ceux des métabolites décrits précédemment avec pour seule différence cette augmentation caractéristique de masse pour certains fragments, prouve que ces molécules sont bien des métabolites du mégazol. Ceci a donc confirmé les travaux de Mespoulet (Annexe 1).

Toutefois, certains des ions précédemment détectés, n'ont pas été retrouvés avec cette technique. Cela ne veut en aucun cas dire qu'ils n'existent pas, mais seulement qu'ils ne font pas partie des ions les plus intenses pouvant être sélectionnés avec cette méthode. Connaissant les temps de rétention et les profils de fragmentation, ils seront intégrés directement dans la méthode MRM afin de vérifier leur présence, en tenant compte de la présence du ¹³C.

Trois nouveaux ions ont ainsi pu être repérés par cette méthode GUS et ont par la suite été analysés en MTS afin d'obtenir des spectres plus précis pouvant permettre d'émettre des hypothèses quant à leur structure. Leurs spectres sont représentés en annexe 1. Ils seront également intégrés à la méthode MRM afin de suivre leur évolution en fonction de la dose de Mégazol.

- Méthode MRM

Cette technique quantitative permet de suivre puis de quantifier l'ensemble des molécules (Mégazol et métabolites) en une seule injection pour chaque échantillon. L'analyse bioinformatique des données a permis de déterminer l'abondance de chaque analyte (Mégazol marqué et métabolites) en mesurant l'aire sous la courbe de chaque pic normalisée par rapport

à l'aire sous la courbe pour le pic du standard interne, le métronidazole. Une comparaison de l'abondance de chaque molécule aux différentes doses et aux divers temps de prélèvement a ainsi pu être obtenue. L'évolution d'abondance des transitions en fonction des doses de mégazol étant similaire pour chaque analyte, la valeur de la transition majoritaire a été retenue pour tracer les graphes pour les prélèvements d'urines et de sérums. Sur la figure 22, est représentée une partie des résultats des urines et sérums qui vont permettre d'effectuer une comparaison des résultats. Nous constatons que certains des métabolites présents dans les urines (colonne A) ne le sont pas ou en très faible quantité dans les sérums (colonne B). Ceci ne veut pas dire qu'ils ne sont pas présents dans le sérum, mais que la méthode utilisée ne permet peut être pas de les détecter à leur concentration. L'ion le plus présent dans le sérum après le Mégazol marqué est l'ion 240. Le reste des résultats est présentés en Annexe 2 pour la comparaison G1-G6, et en Annexe 3 pour la comparaison GA-GE. Au vu de tous les résultats obtenus pour chaque colonne urine ou sérum, nous constatons une proportionnalité entre la quantité relative des différents métabolites détectés et la concentration de Mégazol marqué qui a été administrée aux souris.

Colonne A

Colonne B

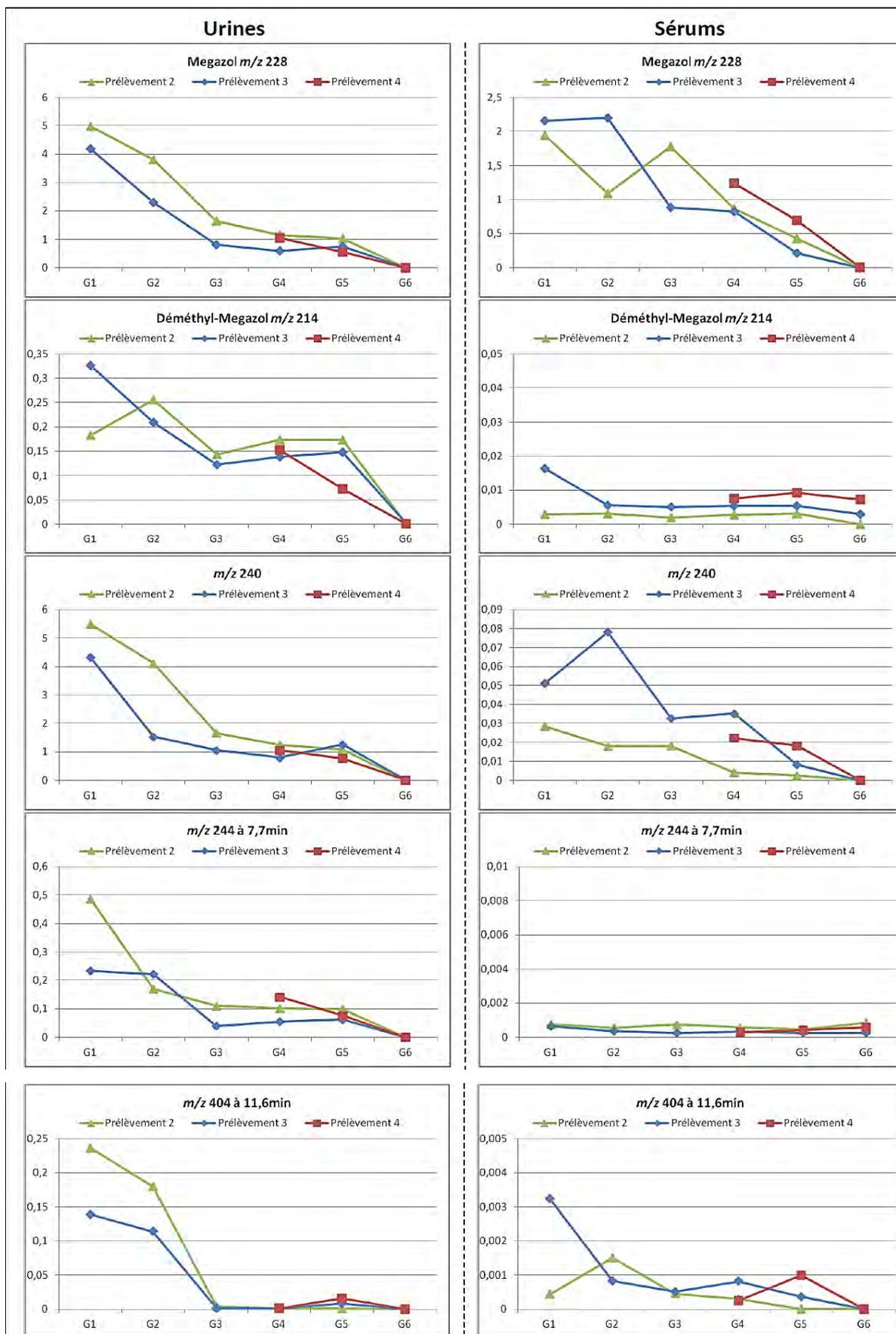


Figure 22. Comparaison du rapport analyte/SI, entre urine et sérum en fonction des lots

2.2. Expérimentation *ex vivo*

- Incubation des microsomes hépatiques humains

Nous avons souhaité réaliser une approche afin de visualiser la stabilité métabolique du Mégazol et l'apparition des métabolites au bout de 30 minutes d'incubation. Malheureusement aucune variation de la métabolisation n'est détectable aux différents temps, ce qui peut être dû à l'absence de métabolisme ou au fait que le Mégazol est trop faiblement métabolisé pour en détecter une variation sur les analyses.

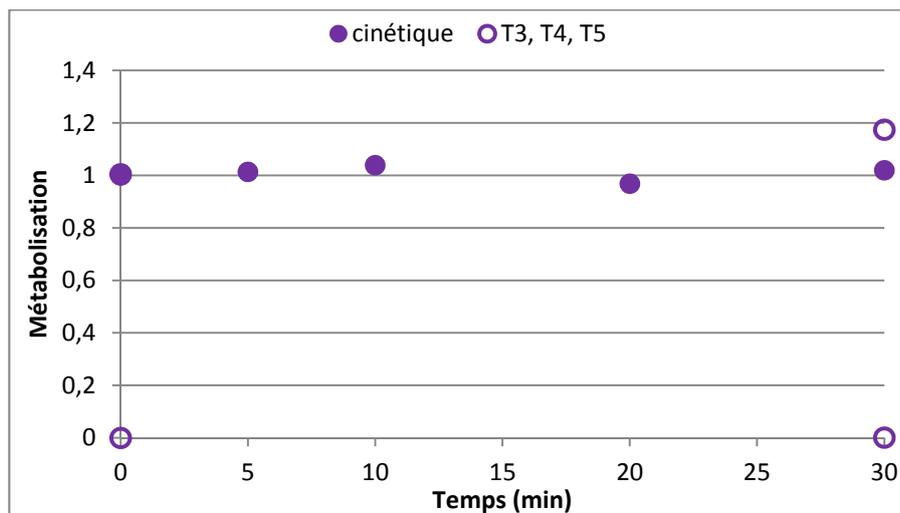


Figure 23. Métabolisme du Mégazol par des microsomes hépatiques humains

Ce graphe représente l'évolution de la métabolisation du Mégazol avec les points ● représentant l'analyte Mégazol, et les points ○ correspondant aux trois témoins au cours des 30 min d'incubation. Les témoins ont été mesurés à T0 et T30 afin de valider la manipulation. Pour le Mégazol, les mesures ont été effectuées à différents temps et nous constatons une absence de variation de la métabolisation sur les 30 min d'incubation. Après calcul du coefficient de variation, nous constatons qu'il est de 0,7 % au niveau des répliquats de cinétique du Mégazol, ce qui montre la forte répétabilité de la manipulation.

La même étude a été réalisée avec des microsomes hépatiques murins afin de comprendre pourquoi *in vivo*, chez les souris une métabolisation est visible, mais absente avec des microsomes humains.

- Incubation des microsomes hépatiques murins

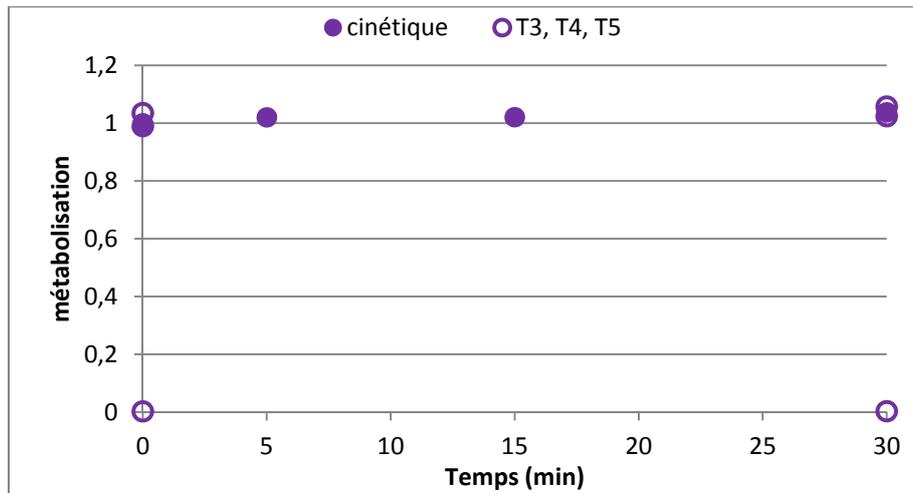


Figure 24. Métabolisme du Mégazol par des microsomes hépatiques murins

Il s'agit du même type de graphique que pour les microsomes humains. Les points ● représentent les données du suivi de la métabolisation du Mégazol en présence de microsomes et de co-substrat, alors que les points ○ sont les témoins.

On constate une absence de variation significative de la cinétique avec ces microsomes murins également. La courbe de l'évolution du Mégazol est stable, il n'y a donc pas ou très peu de métabolisation du Mégazol au cours du temps. Les témoins mesurés à T0 et T30 ont permis de confirmer le bon déroulement de l'expérience. Le coefficient de variation calculé pour les répliquats du Mégazol est de 2 %.

3. Discussions

L'objectif principal de notre étude était de déterminer l'activité trypanocide du Mégazol en partant de concentrations plus faibles que celles retrouvées dans la littérature, afin de mettre en évidence une dose minimale tolérable dépourvue d'effet mutagène mesurable chez l'Homme (Boda *et al.*, 2005; Enanga *et al.*, 2000). L'étude de la stabilité métabolique du Mégazol, ainsi que l'identification et la caractérisation de ses métabolites complèteront nos travaux.

Les résultats fournis dans ce mémoire ne sont qu'une première étape. Les difficultés de synthèse du Mégazol marqué ont perturbé l'avancé de ce travail, et les résultats concernant la dose minimale efficace ne pourront être complètement validés que dans quelques mois, lors de la fin du suivi des souris. Concernant les microsomes hépatiques, la variation de certains paramètres devra être envisagée pour répondre plus en détail à la question de la stabilité et d'une éventuelle cinétique de métabolisation. L'identification des métabolites et leur synthèse auprès d'Alpha Chimica, sont toujours en cours. Malgré tous ces aléas expérimentaux, nous avons pu répondre à certaines interrogations concernant le Mégazol.

La première de nos interrogations concernait la dose minimale efficace du Mégazol. En effet, une telle détermination est nécessaire avant d'envisager des tests cliniques et une éventuelle mise sur le marché d'un médicament. Cette dose minimale efficace, correspond à la dose minimale qu'il est nécessaire d'avoir pour atteindre une efficacité suffisante à l'encontre d'un agent pathogène visé. Au-delà de l'intérêt de l'activité qui doit être toujours présente à des concentrations faibles, la diminution de la toxicité est déterminante. Une molécule possédant une activité thérapeutique recherchée mais entraînant des effets indésirables néfastes ne pourra pas passer en phase d'essai clinique. Concernant le Mégazol, les tests de mutagénicité, réalisés par Nesslany *et al.* ont bloqué la poursuite des travaux de recherche sur cette molécule (Nesslany *et al.*, 2004). Or, ils n'ont pas respecté la balance bénéfice / risque qu'il est nécessaire d'envisager lors des études d'une molécule. Leurs résultats ont démontré que le Mégazol avec une administration de 2000 mg/kg deux fois par jour pendant 2 jours présentaient une réelle mutagénicité. Cependant, de tels tests de toxicité doivent être maîtrisés. La détermination de la dose maximale tolérée ou dose toxique correspond à la limite haute d'une étude. La dose thérapeutique ne doit jamais être supérieure à cette dose toxique. Dans notre étude, la dose maximale testée est de 60 mg/kg pendant 3 jours soit une prise totale de 180 mg/kg. Pour arriver à 2000 mg/kg, cela reviendrait à prendre 33 fois la dose à 60 mg/kg, ce qui n'est pas envisageable. Nous avons donc cherché à déterminer dans un premier temps cette dose

minimale efficace, loin de la dose maximale envisagée dans les tests de toxicité. L'expérimentation animale sur modèle murin a été essentielle. Pour cela nous avons constitué des lots de souris qui ont reçu des doses croissantes de Mégazol en tenant compte des résultats des travaux précédents (Mespoulet, 2012). Toutefois, une telle étude entraîne des variabilités non maîtrisables, comme la mort de souris à la suite de manipulations invasives, la possible régurgitation des souris lors de l'administration *per os* du Mégazol, la quantité de sérum ou d'urine recueillie et l'état d'infection réelle des souris. Autant de paramètres qu'il est nécessaire de prendre en compte lors de l'interprétation des résultats.

Une de nos premières préoccupations était de savoir si les souris parasitées par la souche *Trypanosoma brucei brucei* Antat 1.1E, présentaient bien une invasion de leur SNC par le parasite au moment du traitement, et donc si l'attente des 21 jours post infection, classiquement décrite dans la littérature, avait bien permis le passage des trypanosomes au travers de la BHE (Enanga *et al.*, 1998; Keita *et al.*, 1997). De plus, là où les publications indiquent un décès à 21 +/- 6 jours avec cette souche, nous avons pu constater des décès chez les lots témoins infectés non traités à 30 +/- 5 jours, et d'autres encore plus tardivement (Enanga *et al.*, 1999). Le doute quant à la présence des parasites au niveau du cerveau au 21^{ème} jour fut plus grand. Les rechutes des lots parasités mais traités uniquement avec de la Suramine ont répondu à cette interrogation. Ces lots de souris contrôles ont ainsi permis de s'assurer de l'invasion parasitaire du SNC.

Toutefois, concernant la détermination de la dose minimale efficace, aucune rechute n'a pu être constatée au bout des 2 mois post traitement pour les lots traités au Mégazol. Les analyses restent donc en cours jusqu'au terme de l'étude fixé à 7 mois (Bouteille *et al.*, 1995). L'intervalle des concentrations sélectionnées a été choisi en fonction des résultats de l'étude précédente, où aux mêmes concentrations, des rechutes avaient pu être enregistrées durant ces deux mois post-traitement (Mespoulet, 2012). La question reste donc posée de l'efficacité du traitement actuel, des possibles erreurs de manipulations lors du précédent travail, ou de l'absence de parasites dans le SNC chez certaines souris. Néanmoins, les rechutes survenues lors de la précédente étude, aux doses utilisées ici, ne sont pas nombreuses. Une seule rechute pour le lot à 20 mg/kg et une autre pour le groupe à 40 mg/kg ont été rapportées. Au vu de nos actuels résultats, une hypothèse est émise quant aux erreurs de manipulations lors du travail de 2012, et de l'éventualité d'avoir une réelle activité trypanocide dès la dose de 20 mg/kg. Cette détermination de la dose minimale efficace est importante pour le devenir du Mégazol en santé humaine comme en santé animale. En effet, même si les travaux futurs sur le Mégazol montrent une absence d'efficacité, ou un faible intérêt dans le traitement de la santé humaine, il n'en reste pas moins intéressant du point de vue de la médecine vétérinaire. Actuellement, les traitements

vétérinaires reposent sur quatre sels : acéturate de diminazène, bromure d'homidium, chlorure d'homidium et chlorure d'isoméamidium (Sutcliffe *et al.*, 2004; Leach *et al.*, 1981). Le premier est l'agent thérapeutique le plus utilisé, mais ne possède pas d'action prophylactique, alors que le dernier est le plus connu pour son action prophylactique. Malheureusement depuis plus de 30 ans, aucune nouvelle molécule trypanocide n'a été développée pour le monde vétérinaire, or le mauvais usage des médicaments (sous-dosage, traitements de masse, traitement prophylactique sur l'année), et la vente illégale ont provoqué l'apparition de résistances et donc des pertes de bétail et des pertes économiques pour les populations africaines (Holmes *et al.*, 1997). De plus, une partie de ces molécules possède des propriétés mutagènes connues dont il est nécessaire de tenir compte lors de la vente des viandes. Ainsi, l'étude du Mégazol, avec une dose efficace minimale et dépourvu de toxicité va pouvoir être une alternative aux traitements actuels.

Le suivi de la parasitémie tout au long de l'étude a montré le caractère variable de la charge parasitaire de cette infection avec l'action des anticorps vis-à-vis des parasites, mais également de la capacité de ces derniers grâce à leurs VSG à échapper au système immunitaire de l'hôte. Les rechutes dépendent en grande partie de la capacité de multiplication des parasites et de la charge parasitaire présente au niveau du SNC. Autant de variations qui vont avoir un impact sur la mesure de la parasitémie post-traitement. Parallèlement, une appréciation de l'évolution de la masse des souris a montré une augmentation homogène du poids des différents lots à la suite de l'infection. Nous savons que les souris infectées développent une hépatosplénomégalie, qui est visible à l'œil mais également sur la balance. Les souris parasitées présentent un gros abdomen et ont un poids plus important que les souris non infectées. De plus, dès les traitements administrés, une perte du volume au niveau abdominal est visible ainsi qu'une chute du poids mesurée sur la balance pour les lots traités. Par la suite, toutes les souris se voient prendre du poids en accord avec une alimentation correcte ainsi que leur vieillissement dans le temps.

La recherche des métabolites, et leur détection par la méthode GUS, a permis d'isoler 17 ions dont le Mégazol. Parmi ces 17 molécules, 14 dont le Mégazol sont communes aux résultats fournis lors du premier protocole. L'ensemble de ces caractéristiques est regroupé en annexe 1 où nous voyons pour chaque molécule, deux spectres MS/MS superposables avec pour celui de droite certaines masses molaires augmentées de +1 correspondant à l'intégration du ¹³C confirmant ainsi les découvertes faites précédemment. De plus, nos analyses nous ont également renseignés sur de nouvelles molécules inconnues et qui pourraient être des métabolites avec une structure chimique différente de celles précédemment identifiées :

- Pour l'ion de masse : 300, on constate que son spectre est équivalent au pic 1 de l'ion de masse : 342 en enlevant un groupement de masse 42.
- Pour l'ion de masse : 312, présent en faible quantité, nous partons du Mégazol à 227 auquel on ajoute un groupement de masse 86,
- enfin l'ion de masse : 309, présentant 2 pics, possède un spectre équivalent à l'ion 238 avec ajout d'un groupement de masse 71, et possédant *a minima* une fonction –OH (Annexe 1).

Ce ne sont que des hypothèses structurales qu'il va falloir affiner. Toutes ces hypothèses ne sont possibles qu'après interprétation des spectres MS/MS et des temps de rétention de chacune des molécules, du rapport m/z , de la structure mère du Mégazol ainsi que les différents types de métabolisation qui surviennent dans l'organisme étudié. Nous avons proposé des structures pouvant correspondre à ces masses, mais la vérification auprès de chimistes est nécessaire.

Avec les résultats issus de la méthode MRM, nous constatons une corrélation entre la quantité de Mégazol administrée aux souris en fonction des lots et la détection du Mégazol et de ses métabolites dans les urines. Pour les prélèvements de sérums, les résultats sont beaucoup plus flous. Les échelles de détections sont plus petites ce qui rend l'interprétation plus délicate quant à la présence en faible quantité ou l'absence des métabolites. De plus, d'après les données fournies en annexes 2 et 3 classés par colonne (colonne A les urines, colonne B les sérums), reprenant l'abondance de chaque ion détecté lors des différents prélèvements, on constate une courbe décroissante correspondant à la diminution des doses administrées, ceci est donc bien caractéristique de métabolites d'une molécule. Une comparaison des résultats urine/sérum pour chaque étude a aussi permis de constater que certains des ions présents dans les urines ne le sont pas ou très peu dans le sérum, et ceci essentiellement pour les ions issus d'un métabolisme de phase 2 qui pourraient déjà avoir été filtrés du sérum vers les urines au moment du prélèvement grâce à leur plus grande hydrophilie une fois conjugués. Pour les autres métabolites présents en plus faible quantité dans le sérum, l'hypothèse émise quant à leur faible proportion est que leur métabolisation commence à peine au moment du prélèvement, rendant ainsi leur détection très subjective. De plus, les recueils des urines dépendent d'une part de la durée de ce recueil qui est cumulative (12 ou 24h) mais également du volume urinaire émis par les souris des différents lots. Plus les souris urinent, plus grande sera la dilution des molécules et plus faible sera leur détection lors de l'analyse. Toutes ces données doivent donc être intégrées durant l'observation de ces graphes qui ne représentent là que le ratio (aire sous la courbe de l'analyte / aire sous la courbe du standard interne le Métronidazole) ce qui équivaut à une concentration et non pas à la quantité totale "urinée" sur la durée de prélèvement. Concernant

l'abondance des ions détectés lors des prélèvements de sérums, il s'agit là d'une représentation de prélèvement à un temps précis et défini. Ce qui rend les résultats différents de ceux des urines. L'ion le plus présent dans le sérum après le Mégazol, est l'ion 240 (239 dans la précédente étude), qui avait été remarqué quant à l'hypothèse d'être un métabolite spécifique des souris non retrouvé chez l'Homme. Des études le concernant devront donc être menées afin de savoir s'il s'agit effectivement d'un métabolite typiquement murin, de déterminer sa structure et son activité et /ou toxicité.

Les microsomes hépatiques, modèle d'étude par excellence pour l'étude du métabolisme des médicaments, ont été utilisés dans notre protocole pour évaluer la stabilité métabolique du Mégazol. Rappelons que la métabolisation d'un médicament fait intervenir diverses enzymes. Les enzymes les plus impliquées dans la phase 1 sont les cytochromes P450 (CYP), définies comme des enzymes ubiquitaires intervenant dans le métabolisme de substrats endogènes ou exogènes, notamment médicamenteux. Ils se répartissent en familles (CYP1-2-3) et sous-familles (CYP1A -2C -2D -3A) comprenant elles-mêmes des isoenzymes (CYP3A4, CYP2D6, CYP2C8, CYP1A2). Le métabolisme des médicaments, principalement hépatique, fait intervenir le plus souvent plusieurs CYP. Plus rarement un seul CYP ou un CYP préférentiel : c'est dans ces circonstances que le risque d'interaction est le plus élevé (Wrighton *et al.*, 1992). Chez l'Homme, le CYP3A4 est quantitativement le plus important : il représente 36 % du contenu hépatique en CYP et est également présent au niveau intestinal (entérocytes) (Kashuba *et al.*, 2001). Environ la moitié des médicaments métabolisés le sont par l'intermédiaire du CYP3A4.

Dans l'étude du Mégazol et lors des précédents travaux, une mise au point de l'utilisation de microsomes humains avait été faite pour déterminer la présence de métabolites (Mesouplet, 2012). Or, aucun résultat positif n'avait pu être validé. Nous avons donc décidé de réitérer la manipulation en partant également de microsomes hépatiques humains afin de suivre la cinétique de métabolisation de la molécule. Les résultats ne furent pas concluants. L'absence de variation nous a incités à nous interroger sur l'existence d'un métabolisme plus oxydatif chez le rongeur, ce qui expliquerait la formation de métabolites chez les souris et non par des microsomes humains (Lu *et al.*, 2006). Nous avons donc effectué la même expérience, en partant de microsomes hépatiques murins afin de comprendre ce phénomène. Malheureusement, les résultats furent similaires aux précédents. Aucune métabolisation ne fut détectée. Des hypothèses ont donc été émises quant à l'absence de cette variation sur les microsomes alors qu'on constate la présence de métabolites lors du travail *in vivo* sur les souris.

Premièrement, la détection des métabolites à la suite des tests *in vivo* est certes présente mais de manière peu importante. Le Mégazol est faiblement métabolisé dans l'organisme car il s'agit d'une molécule stable, ce qui se retrouve lors d'une incubation avec des microsomes. En effet, lors de nos tests, nous cherchions à détecter des métabolites. Les résultats étant négatifs, cela nous a poussés à déterminer la stabilité métabolique. En ne voyant aucune variation du métabolisme au cours du temps, nous avons eu confirmation de la stabilité de la molécule. De plus, la technique de détection optimisée pour les urines pourrait ne pas être assez sensible pour les microsomes, car la production des métabolites n'est pas suffisante pour une détection optimale. Un autre point, pouvant expliquer ces résultats est que nous avons effectué notre manipulation sur une cinétique de 30 minutes, temps au bout duquel plus de la moitié du NADPH est consommé, ce qui diminue son action et celle des microsomes (Mazur *et al.*, 2009). Dans l'organisme, les prélèvements étaient effectués au plus tôt une heure après l'administration de Mégazol pour les sérums et sur 12 ou 24h pour les urines (Enanga *et al.*, 1999). Il se peut donc que le recueil sur 30 minutes ne soit pas suffisamment long pour que la molécule soit dégradée par les enzymes hépatiques. Or, le temps de demi-vie du Mégazol seul (sans administration préalable de Suramine) est de 42 min, ce qui correspond à notre temps de mesure (Enanga *et al.*, 1999). Nous devrions donc voir une variation sur 30 min même minime. Il serait intéressant de modifier les conditions expérimentales afin d'optimiser les résultats, et cela en utilisant un système régénérant le NADPH afin d'effectuer des tests sur une plus longue durée (Mazur *et al.*, 2009). Une autre approche serait de partir d'un volume réactionnel 10 ou 100 fois plus important de microsomes et de Mégazol, puis de concentrer les extraits pour maximiser les chances de détecter les métabolites faiblement produits. Une dernière hypothèse émise devant ces résultats, est le fait que la détection des métabolites *in vivo* se fait sur souris parasitées, il est donc possible que la métabolisation du Mégazol ne provienne pas majoritairement des souris mais des parasites. Des tests réalisés sur des souris non parasitées mais traitées au Mégazol ont confirmé ces dires. En effet, ne ressorte qu'après analyse en spectrométrie de masse le Mégazol en forte proportion, et deux métabolites identifiés dans les tests *in vivo* (l'ion 213 déméthyl-Mégazol, et l'ion 403) plus faiblement. Le reste n'appartenant qu'au bruit de fond et ne pouvant pas être interprété. Une étude a donc été envisagée, afin de tester le Mégazol sur des plaques de culture contenant des parasites et de récupérer le milieu de culture après différents temps pour l'analyser et mesurer l'éventuelle production de métabolites.

La synthèse de certains métabolites issus du Mégazol est la conclusion de ce travail, et ouvre de nombreuses perspectives thérapeutiques. Rappelons que nous avons sélectionné 4

métabolites : l'ion 213 déméthyl-Mégazol, l'ion 243 Sulfoxy-Mégazol, l'ion 243 HydroxyMégazol et l'ion 243 Hydroxylamine-Mégazol, décrits lors de l'étude antérieure et qui possédaient un intérêt quant à leur structure chimique proche de celle du Mégazol (Mespoulet, 2012). Nous avons donc décidé de les faire synthétiser auprès d'Alpha Chimica, société spécialisée dans la synthèse de molécules à partir de divers catalyseurs, pour pouvoir les tester *in vitro* sur des cultures de parasites, et ainsi déterminer un effet trypanocide. Mais toutes les réactions effectuées en vue d'obtenir les métabolites d'intérêt ont montré que le Mégazol est très peu réactif aussi bien à température ambiante, 22°C ou à 40°C, et quel que soit le système catalytique utilisé. Le Mégazol n'est pas dégradé, il se retrouve entièrement à la fin de chaque réaction. Ceci a donc posé un problème quant à la poursuite de nos travaux. Il a été envisagé de continuer cette synthèse de métabolites en prenant de nouvelles conditions expérimentales permettant l'oxydation du Mégazol et donc l'accès aux métabolites d'intérêt. Le Mégazol est une molécule stable du point de vue chimique ce qui la rend peu sensible à l'oxydation, ceci a notamment été vu lors d'expériences sur les microsomes. Après discussion avec le laboratoire Alpha Chimica, un tel problème avait déjà été vu avec une autre molécule connue pour ses propriétés antifongiques et antiparasitaires, la Canthin-6-one de formule $C_{14}H_8N_2O$, dont la transformation en catalyse biomimétique était très faible. Cette molécule dérivée des 1,5-diazanaphthalenes, a été étudiée pour lutter contre la Trypanosomiase Amérindienne, ou maladie de Chagas. Elle est retrouvée dans diverses plantes et certains de ces dérivés (Ferreira *et al.*, 2004). Des études non publiées, ont rapporté après tests sur microsomes murins une très faible métabolisation de la molécule par les CYP450. Ces renseignements sur cette molécule nous laissent donc à penser que la synthèse des métabolites du Mégazol sera dure. Si Alpha Chimica ne réussit pas à finaliser ce travail de synthèse, le dernier recours sera la synthèse chimique des métabolites.

Conclusion et Perspectives

Nous avons voulu déterminer une dose minimale efficace du Mégazol bien inférieure aux doses retrouvées dans la littérature. Cette dose comprise entre 20 et 60 mg/kg consent à diminuer la mutagénicité décrite. Ce travail ouvre donc des perspectives intéressantes quant à son utilisation en médecine vétérinaire par exemple. L'autre objectif est l'identification de métabolites. C'est au total 17 métabolites maintenant sur lesquels il faut travailler pour mettre en lumière un potentiel effet trypanocide. Il sera nécessaire de confirmer les hypothèses émises sur leur structure. Avec notre travail, 4 métabolites sont caractérisables (l'ion 213 et les trois ions 243). La synthèse de ces molécules si elle n'est pas possible par voie biomimétique devra se faire en collaboration avec des chimistes capables de trouver des synthèses permettant leur développement.

Les perspectives à ce travail sont nombreuses. La détermination de la dose minimale et les tests de toxicité permettront d'ouvrir un dossier d'AMM et d'envisager des essais cliniques allant jusqu'à la commercialisation d'un nouvel agent trypanocide, le Mégazol. Les métabolites sélectionnés pourront également avoir un intérêt majeur qu'il faudra étudier afin de vérifier leur activité, et leur toxicité. Des tests *in vitro* permettront d'apprécier en premier lieu cet aspect, pour envisager par la suite des tests *in vivo* sur l'animal. Une étude tout particulière pourra être envisager pour l'ion 240, qui semble être un dérivé nitroso. Or ces dérivés sont connus pour leur mutagénicité. Il sera donc intéressant de chercher à savoir si la mutagénicité décrite pour le Mégazol ne provient pas de ce métabolite.

La découverte d'un nouveau médicament luttant contre la THA, permettrait de remettre à l'ordre du jour la lutte contre cette maladie tropicale négligée, et ouvrirait un espoir pour les populations africaines touchées.

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.
- Agrawal S., Anderson P., Durbeej M., Van Rooijen N., Ivars F., Opdenakker G., and Sorokin L., “Dystroglycan is selectively cleaved at the aprenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis”, *The Journal of Experimental Medicine*, 203, 1007-1019, 2006.
- Ames, B., McCann J., and Yamasaki E., “Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test”, *Mutation Research*, 31, 347-364, 1975.
- Amin D., Rottenberg M., Thomsen A., Mumba D., Fenger C., Kristensson K., Büscher P., Finsen B., and Masocha W., “Expression and role of CXCL10 during the encephalitic stage of experimental and clinical African trypanosomiasis”, *The Journal of Infections Diseases*, 200, 1556-65, 2009.
- Bacchi CJ., Garofalo J., Ciminelli M., Rattendi D., Goldberg B., McCann PP., and Yarlett N., “Resistance to DL- α -difluoromethylornithine by clinical isolates of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Role of S-adenosylmethionine”, *Biochemical Pharmacology*, 46, 471-81, 1993.
- Bacchi C., Nathan H., Livingston T., Valladares G., Saric M., Sayer P., Njogu A., and Clarkson A., “Differential susceptibility to D-L- α -difluoromethylornithine in clinical isolates of *Trypanosoma brucei rhodesiense*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 1183-1188, 1990.
- Bailly C., Donkor I., Gentle D., Thornalley M., and Waring M., “Sequence-selective binding to DNA of cis- and trans- butamidine analogues of the anti-*Pneumocystis carinii pneumonia* drug pentamidine”, *Molecular Pharmacology*, 46, 313-22, 1994.
- Barrett S., and Barrett MP., “Anti-sleeping sickness drugs and cancer chemotherapy,” *Parasitology Today*, 16, 7-9, 2000.
- Barrett MP., and Fairlamb A., “The Biochemical Basis of Arsenical–Diamidine Crossresistance in African Trypanosomes”, *Parasitology Today*, 15, 136-140, 1999.
- Barrett MP., Fairlamb A., Rousseau B., Chauvière G., and Perié J., “Uptake of the Nitroimidazole Drug Megazol by African Trypanosomes”, *Biochemical Pharmacology*, 59, 615-620, 2000.

- Barry J.D., “The relative Significance of mechanism of antigenic variation in African trypanosomes”, *Parasitology Today*, 13, 212-218, 1997.
- Bass K., Sommer J., Chen Q., and Wang C., “Mouse ornithine decarboxylase is stable in *Trypanosoma brucei*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 11034-11037, 1992.
- Benaim G., Lopez-estraño C., Docampo R., and Moreno S., “A calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump in plasma-membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*; selective inhibition by pentamidine”, *Biochemistry Journal*, 296, 759-763, 1993.
- Berkelhammer G., and Asato G., “2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadazole: a new antimicrobial agent”, *Science*, 162, 1146, 1968.
- Bisser S., and Courtioux B., “La maladie du sommeil, fin d’une épidémie ?”, *Revue Neurologique*, 168, 230-238, 2012.
- Bisser S., N’Siesi FX., Lejon V., Preux MP., Van Nieuwenhove S., Miaka Mia Bilenge C., and 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, 322-329, 2007.
- Bitonti A., McCann P., and Sjoerdsma A., “Necessity of antibody response in the treatment of African trypanosomiasis with α -difluoromethylornithine”, *Biochemical Pharmacology*, 35, 331-334, 1996.
- Bitonti A., and Dumont J., “Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and methylglyoxal bis (guanylhiazone)”, *Biochemistry Journal*, 237, 685-689, 1986.
- Blum J., Nkunku S., and 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, 390-400, 2001.
- Boda C., Enanga B., Courtioux B., Breton JC., and Bouteille B., “Trypanocidal activity of Methylene Blue. Evidence for *in vitro* efficacy and *in vivo* failure”, *Chemotherapy*, 935, 1-4, 2005.
- Bonnet J., Boudot C., and Courtioux B., “New and accurate field-adapted diagnostic methods for Human African trypanosomiasis”, *BioMed Research International*, en révision le 21.06.2015.
- Bot C., Hall B., Alvarez G., Di Maio R., Gonzalez M., Cerecetto H., and Wilkinson S., “Evaluating 5-Nitrofurans as Trypanocidal Agents”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 1638-1647, 2013.

- Bouteille B., Marie-Daragon A., Chauvière G., de Albuquerque C., Enanga B., Dardé ML., Vallat JM., Périé J., and Dumas M., “Effect of megazol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice”, *Acta Tropica*, 60, 73-80, 1995.
- Bouteille B., and Chauvière G., « Implication du megazol dans la chimiothérapie des trypanosomes », *Médecine Tropicale*, 59, 321-330, 1999.
- Boveris A., Sies H., Martino E., Docampo M., Turrens J., and Stoppani A., “Deficient Metabolic Utilization of Hydrogen Peroxide in *Trypanosoma cruzi*”, *Biochemical Journal*, 188, 643-648, 1980.
- Brun R., Blum J., Chappuis F., and Burri C., « Human African trypanosomiasis”, *Seminar Lancet*, 375, 148-59, 2010.
- Buguet A., Bourdon L., Bisser S., Chapotot F., Radomski M., and Dumas M., ‘Sleeping sickness: major disorders of circadian rhythm”, *Medicine Tropicale*, 61, 328-339, 2001.
- Burden E., Schumacher E., and Kelly M., “2-Amino-5- (1-Methyl-5-Nitro-2-Imidazolyl) – 1,3,4-Thiadiazole, a new antimicrobial agent. IX. Action against subcutaneous *Trichomonas vaginalis* infections in mice”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8, 538-540, 1968.
- Carter N., Berger B., and Fairlamb A., “Uptake of Diamidine Drugs by the P2 Nucleoside Transporter in Melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 28153-28157, 1995.
- Carter N., Berger B., and Fairlamb A., “Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 28153-28157, 1995.
- Chappuis F., Stivanello E., Adams K., Kidane S., Pittet A., and Bovier P., “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”, *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71, 313-317, 2004.
- Chappuis F., Loutan L., Simarro, P., Lejon V., and Büscher P., “Options for Field Diagnosis of Human African Trypanosomiasis”, *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 133-146, 2005.
- Chappuis F., Udayraj N., Stietenroth K., Meussen A., and Bovier P., “Eflornithine Is Safer than Melarsoprol for the Treatment of Second-Stage *Trypanosoma brucei gambiense* Human African Trypanosomiasis”, *Clinical Infection Diseases*, 41, 748-51, 2005.

- Chauvière G., Bouteille B., Enanga B., de Albuquerque C., Croft S., Dumas M., and Perié J., « Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous to megalozol, a trypanocidal lead,” *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 427-440, 2003.
- Chello P., and Jaffe J., “Comparative properties of trypanosomal and mammalian thymidine kinases”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 43, 543-562, 1972.
- Cunningham M., Zvelebil M., and Fairlamb A., “Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals”, *European Journal of Biochemistry*, 221, 285-295, 1994.
- Damper D., and Patton C., “Pentamidine transport in *Trypanosoma brucei* – kinetics and specificity”, *Biochemical Pharmacology*, 25, 271-276, 1976.
- Delain E., Brack C., Riou G., and 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, 200-18, 1971.
- De Koning H., MacLeod A., Barrett M., Cover B., and Jarvis S., “Further evidence for a link between melarsoprol resistance and P2 transporter function in African trypanosomes”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 106, 181-185, 2000.
- De Koning H., and Jarvis S., “Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter”, *Acta Tropica*, 80, 245-250, 2001.
- De Koning H., “Transporters in African trypanosomes: role in drug action and resistance”, *International Journal for Parasitology*, 31, 512-522, 2001.
- De Koning H., “Uptake of Pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: Implications for cross-resistance with arsenicals”, *Molecular Pharmacology*, 59, 586-592, 2001.
- De Koning H., Anderson L., Stewart M., Burchmore R., Wallace L., and Barrett M., “The Trypanocide diminazene aceturate is accumulated predominantly through the TbAT1 purine transporter: Additional insights on diamidine resistance in African trypanosomes”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1515-1519, 2004.
- De Koning H., Gould M., Sterk G., Tenor H., Kunz S., Luginbuehl E., and Seebeck T., “Pharmacological validation of *Trypanosoma brucei* phosphodiesterases as novel Drug targets”, *The Journal of Infectious Diseases*, 37, 206-229, 2012.
- De Morais M., Ferreira RCC., and Ferreira LCS., “Mutagenic activation of CL64,855, an anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivant, by bacterial nitroreductases”, *Genetics and Molecular Biology*, 21, 567-572, 1998.

- Docampo R., De Boiso JF., Boveris A., and Stoppani A., "Localization of Peroxidase Activity in *Trypanosoma cruzi* Microbodies", *Experientia*, 32, no. 8, 972-5, 1976.
- Docampo R., Moreno S., Stoppani A., Leon W., Cruz F., Villalta F., and Muniz R., "Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*", *Biochemical Pharmacology*, 30, 1947-1951, 1981.
- Drake S., Lampasona V., Nicks HL., and Schwarzmans SW., "Pentamidine isethionate in the treatment of *Pneumocystis carinii pneumonia*", *Clinical Pharmacology*, 4, 507-16, 1985.
- Drennan M., Stijlemans B., Van Den Abbeele J., Quesniaux V., Barkhuizen M., Brombacher F., De Baetselier P., Ryffel B., and Magez S., "The induction of a Type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent", *The Journal of Immunology*, 175, 2501-2509, 2005.
- Duggan A., and Hutchinson M., "Sleeping sickness in Europeans: a review of 109 cases", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69, 134-131, 1966.
- Edwards D., "Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms I. Mechanisms of action", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 31, 9-20, 1993.
- Edwards D., "Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms II. Mechanisms of resistance", *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 31, 201-210, 1993.
- Enanga B., Ariyanayagam M., Stewart M., and Barrett M., "Activity of Megazol, a Trypanocidal Nitroimidazole, Is Associated with DNA Damage", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 3368-3370, 2003.
- Enanga B., Mezui Me Dong J., Boudra H., Debrauwer L., Dubreuil G., Bouteille B., Chaivère G., Labat C., Dumas M., Périé J., and Houin G., « Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol in a *Trypanosoma brucei gambiense* primate model of Human African Trypanosomiasis", *Arzneimittel-Forschung/Drug research*, 50, 158-162, 2000.
- Enanga B., Boudra H., Chauvière G., Labat C., Bouteille B., Dumas M., and Houin G., "Pharmacokinetics, metabolites and excretion of megazol, a new potent trypanocidal drug in animals", *Arzneimittel-Forschung/Drug research*, 49, 441-447, 1999.
- Enanga B., Keita M., Chauvière G., Dumas M., and 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 and International Health*, 3, 736-741, 1998.

- Enanga B., Labat C., Boudra H., Chauvière G., Keita M., Bouteille B., Dumas M., and Houin G., “Simple high-performance liquid chromatographic method to analyse megazol in human and rat plasma”, *Journal of Chromatography B*, 696, 261-266, 1997.
- Engelhardt B., and Wolburg H., “Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?”, *Immunology*, 34, 2955-63, 2004.
- Eperon G., Balasegaram M., Potet J., Mowbray C., Valverde O., and Chappuis F., “Treatment options for second stage gambiense Human African trypanosomiasis,” *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12, 1407-1471, 2014.
- Ericsson O., Schweda E., Bronner U., Rombo L., Friden M., and Gustafsson 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, 243-251, 1997.
- Fairlamb A., and Bowman I., “*Trypanosoma brucei*: Maintenance of Concentrated Suspensions of Bloodstream Trypomastigotes in Vitro Using Continuous Dialysis for Measurement of Endocytosis”, *Experimental Parasitology*, 49, 366-380, 1980.
- Fairlamb A., Henderson G., and Cerami A., “Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, 2607-2611, 1989.
- Fairlamb A., Smith K., and Hunter KJ., “The interaction of arsenical drugs with dihydrolipoamide and dihydrolipoamide dehydrogenase from arsenical resistant and sensitive strains of *Trypanosoma brucei brucei*”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 53, 223-31, 1992.
- Fairlamb A., “Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects”, *TRENDS in Parasitology*, 19, 488-494, 2003.
- Fairlamb A., and Bowman I., “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, 315-333, 1980.
- Ferreira RCC., and Ferreira LCS., “Mutagenicity of CL 64 855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug”, *Mutation Research*, 171, 11-15, 1986.
- Ferreira RCC., and Ferreira LCS., “CL 64855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug, is also mutagenic in the Salmonella / microsome assay”, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81, 49-52, 1986.

- Ferreira RCC., Schwarz U., and Ferreira LCS., “Activation of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs to genotoxic metabolites promoted by mammalian microsomal enzymes”, *Mutation Research*, 204, 577-583, 1988.
- Ferreira ME., Fournet A., Rojas A., Hocquemiller R., and Poupon E., “Use of canthin-6-one, plant extracts containing same and derivatives thereof in the treatment of trypanosomiasis,” Brevet WO 2004050092 A1, 2004.
- Filardi L., and Brener Z., “A nitroimidazole- thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections”, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 76, 293-297, 1982.
- Franco J., Simarro P., Diarra A., and Jannin J., “Epidemiology of human African trypanosomiasis”, *Clinical Epidemiology*, 4, 257-275, 2014.
- Gentilini M., and Duflo B., *Médecine Tropicale*, édité par Flammarion, 31-103, 1986.
- Ghoda L., Phillips M., Bass K., Wang C., and 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, 11823-11826, 1990.
- Girault S., Baillet S., Horvath D., Lucas V., Davioud-Charvet E., Tartar A., and Sergheraert C., “New potent inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* in the 2-aminodiphenylsulfide series”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 32, 39-52, 1997.
- Gregus Z, and Gyurasics A, “Role of glutathione in the biliary excretion of the arsenical drugs trimelarsan and melarsoprol”, *Biochemical Pharmacology*, 59, 1375-1385, 2000.
- Grishin N., Osterman A., Brooks H., Phillips M., and Goldsmith E., “X-ray Structure of Ornithine Decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: The Native Structure and the Structure in Complex with α -Difluoromethylornithine”, *Biochemistry*, 38, 15174-15184, 1999.
- Hall B., Bot C., and Wilkinson S., “Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites”, *The Journal Biological Chemistry*, 286, 13088-13095, 2011.
- Hamadien M., Lycket N., and Bakhiet M., “Induction of the trypanosome lymphocyte-triggering factor (TLTF) and neutralizing antibodies to the TLTF in experimental African trypanosomiasis”, *Immunology*, 96, 606-611, 1999.
- Henderson G., Ulrich P., Fairlamb A., Rosenberg I., Pereira M., Sela M., and Cerami A., ““Subversive” substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: Alternative approach to chemotherapy of Chagas disease”, *Proceedings National Academy and Sciences*, 85, 5374-5378, 1988.

- Hess DA., and Rieder MJ., “The role of reactive drug metabolites in immune-mediated adverse drug reactions”, *The Annals of Pharmacotherapy*, 31, 1378-87, 1997.
- Holmes PH., “New approaches to the integrated control of trypanosomosis,” *Veterinary Parasitology*, 71, 121-35, 1997.
- Hua S., Li X., Coffino P., and Wang 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, 10264-10271, 1995.
- Hubert D., and Barrett MP., “Uptake and mode of action of drugs used against sleeping sickness”, *Biochemical Pharmacology*, 61, 1-5, 2001.
- Hutchings N., Donelson J., and Hill K., “Trypanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in African trypanosomes”, *The Journal of Cell Biology*, 156, 867-877, 2002.
- Iten M., Mett H., Evans A., Enyaru J., Brun R., and Kaminsky R., “Alterations in ornithine decarboxylase characteristics account for tolerance of *Trypanosoma brucei* rhodesiense to D,L- α -difluoromethylornithine”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 1922-1925, 1997.
- Jacobs R.T., Nare B., Wring S., Orr M.D., Chen D., Sligar JM., Jenks M., Noe R., Bowling T., Mercer L., Rewerts C., Gaukel E., Owens J., Parham R., Randolph R., Beaudet B., Bacchi C.J., Yarlett N., Plattner J., Freund Y., Ding C., Akama T., Zhang Y., Brun R., Kaiser M, Scandale I., and Don R., “SCYX-7158, an orally-active Benzoxaborole for the treatment of stage 2 Human African trypanosomiasis,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1151, 2011.
- Jaffe J., McCormack J., and Meymarian E., “Comparative properties of schistosomal and filarial dihydrofolate reductases”, *Biochemical Pharmacology*, 21, 719-731, 1972.
- Jamonneau V., Truc P., Garcia A., Magnus E., and Büscher P., “Preliminary 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 Côte d’Ivoire: considerations for mass-screening”, *Acta Tropica*, 76, 175-183, 2000.
- Jennings F., Whitelaw D., Holmes P., Chizyuka H., and Urquhart G., “The brain as a source of relapsing *Trypanosoma brucei* infection in mice after chemotherapy”, *International Journal for Parasitology*, 9, 381-384, 1979.
- Jennings F., Uruquhart G., Murray P., and Miller B., “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, 693-698, 1983.
- Kappagoda S., Singh U., and Blackburn B., “Antiparasitic Therapy”, *Mayo Clinic Proceedings*, 86, 561-583, 2011.
 - Kashuba A., and Bertino J., “Mechanism of drug interaction,” *Drugs Interactions in Infectious Diseases*, 13-38, 2001.
 - Keiser J., Ericsson O., and Burri C., “Investigations of the metabolites of the trypanocidal drug melarsoprol”, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 67, 478-488, 2000.
 - Keita M., Bouteille B., Enanga B., Vallat JM., and Dumas M., “*Trypanosoma brucei brucei*: a long-term model of human african trypanosomiasis in mice, meningo-encephalitis, astrocytosis, and neurological disorders”, *Experimental Parasitology*, 85, 183-192, 1997.
 - Kennedy P., “Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges”, *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 496-504, 2004.
 - Kennedy P., “Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness)”, *Lancet Neurology*, 12, 186-94, 2013.
 - Krauth-Siegel R., Enders B., Henderson G., Fairlamb A., and Schirmer R., “Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme”, *European Journal of Biochemistry*, 164, 123-128, 1987.
 - Krauth-Siegel R., and Schöneck R., “Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design”, *Flavoprotein Structure and Mechanism*, 9, 1138-1146, 1995.
 - Kristensson K., Nygard M., Bertini G., and Bentivoglio M., “African trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry and effects on sleep and synaptic functions”, *Progress in Neurobiology*, 91, 152-171, 2010.
 - Kubata B., Duszenko M., Martin K., and Urade Y., « Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites”, *Elsevier*, 23, 325-331, 2007.
 - Lages-Silva E., Filardi L., and Brener Z., “Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages”, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85, 401-405, 1990.
 - Lanteri C., Stewart M., Brock J., Alibu V., Meshnick S., Tidwell R., and Barrett M., “Roles for the *Trypanosoma brucei* P2 Transporter in DB75 Uptake and Resistance”, *Molecular Pharmacology*, 70, 1585-1592, 2006.

- Lanteri C., Tiswell R., and Meshnick S., “The Mitochondrion Is a Site of Trypanocidal Action of the Aromatic Diamidine DB75 in Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 875-882, 2008.
- Laveissière C., and Penchenier L., *Manuel de lutte contre la maladie du sommeil*, IRD Editions, 4, 1-366, 2005.
- Layton H., Bachmann H., Kemp G., Gale G. and Kiser J., “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, 528-533, 1968.
- Leach T., and Roberts C., “Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of animal trypanosomiasis in the eastern hemisphere,” *Pharmacology & Therapeutics*, 13, 91-147, 1981.
- Leone M., Marpegan L., Bekinschtein T., Costas M., and Golombek D., “Suprachiasmatic Astrocytes as an interface for immune-circadian signaling”, *Journal of Neuroscience research*, 84, 1521-27, 2006.
- Le Trant N., Meshnick S., Kitchener K., Eaton J., and Cerami A., “Iron-containing Superoxide Dismutase from *Crithidia fasciculata*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 125-130, 1983.
- Liu Y., Tidwell R., and Leibowitz MJ., “Inhibition of *in vitro* splicing of a group I intron of *Pneumocystis carinii*,” *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41, 31-38, 1994.
- Loiseau P., Lubert P., and Wolf JG., “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 of Chemotherapy*, 44, 2954-2961, 2000.
- Lu C., Li P., Gallegos R., Uttamsingh V., Xia C., Miwa GT., Balani SK., and Gan LS., “Comparison of intrinsic clearance in liver microsomes and hepatocytes from rats and humans: evaluation of free fraction and uptake in hepatocytes,” *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 125-130, 1983.
- Lumsden W., Kimber C., Evans D., and 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, 313-317, 1979.
- Lundkvist G., Kristensson K., and Bentivoglio M. “Why trypanosomes cause sleeping sickness”, *Physiology*, 19, 198-206, 2004.
- Mansfield J.M., and Paulnock D.M., “Regulation of innate and acquire immunity in African trypanosomiasis”, *Parasite Immunology*, 27, 361-371, 2005.

- Mansfield J.M., and Paulnock D.M., “Genetic manipulation of African trypanosomes as a tool to dissect the immunobiology of infection”, *Parasite Immunology*, 30, 245-253, 2008.
- Masocha W., Robertson B., Rottenberg M., Mhlanga J., Sorokin L., and Kristensson K., “Cerebral vessel laminins and IFN γ define *Trypanosoma brucei brucei* penetration of the blood-brain barrier”, *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 689-694, 2004.
- Maya JD., Bollo S., Nunez-Vergara L., Squella J., Repetto Y., Morello A., Périé J., and Chauvière G., “*Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives”, *Biochemical Pharmacology*, 65, 999-1006, 2003.
- Mazur C., Kenneke JF., Goldsmith MR., and Brown C., “Contrasting influence of NADPH and a NADPH-regenerating system on the metabolism of carbonyl-containing compounds in hepatic microsomes,” *Drug Metabolism and Disposition*, 37, 1801-1805, 2009.
- Mespoulet E., “Activite trypanocide du mégazol sur le modele murin à *Trypanosoma brucei brucei* : recherche d’une dose efficace et identification des metabolites”, *Thèse pour le diplôme d’état de docteur en pharmacie*, 1-177, 2012.
- Metcalf B., Bey P., Danzin C., Jung MJ., Casara P., and Vever JP., “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, 2551-2553, 1978.
- Morello A., “The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90C, 1-12, 1988.
- Missot O., and Opperdoes F., “The phosphoglycerate kinases from *Trypanosoma brucei*. A comparison of the glycosomal and the cytosolic isoenzymes and their sensitivity towards Suramin”, *European Journal of Biochemistry*, 162, 493-500, 1987.
- Morgan HP., McNae I., Nowicki M., Zhong W., Michels P., Auld D., Fothergill-Gilmore L., and Walkinshaw M., “The trypanocidal drug suramin and other trypan blue mimetics are inhibitors of pyruvate kinases and bind to the adenosine site”, *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 31232-31240, 2011.
- Morty R., Troeberg L., Pike R., Jones R., Nickel P; Lonsdale-Eccles J., and Coetzer T., “A trypanosomes oligopeptidase as a target for the trypanocidal agents pentamidine, diminazene and suramin”, *FEBS Letters*, 433, 251-256, 1998.
- Munday J., Eze A., Baker N., Glover L., Clucas C., Andrès D., Natto M., Teka I., McDonald J., Lee R., Graf F., Ludin P., Burchmore R., Turner C., Tait A., MacLeod A., Mäser P., Barrett M., Hom D., and De Koning H., “*Trypanosoma brucei* aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic

- determinant of resistance to these drugs”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 651-663, 2014.
- Munday J., Tagoe D., Eze A., Krezdorn J., Rojas Lopez K., Alkhalidi A., McDonald F., Still J., Alzahrani K., Settimo L., and De Koning H., “Functional analysis of drug resistance-associated mutations in the *Trypanosoma brucei* Adenosine Transporter 1 (TbAT1) and the proposal of a structural model for the protein”, *Molecular pharmacology*, 1-37, 2015.
 - Nessler F., Brugier S., Mouriès MA., Le Curieux F., and Marzin D., “*In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megalol”, *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 560, 147-158, 2004.
 - Nikolskaia O., de A. Lima A., Kim Y., Lonsdale-Eccles J., Fukuma T., Scharfstein J., and Grab D., “Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease”, *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 2739-47, 2006.
 - Oberle M., Balmer O., Brun R., and Roditi I., “Bottlenecks and the maintenance of minor genotypes during the life cycle of *Trypanosoma brucei*”, *PLoS Pathogens*, 6, e1001023, 2010.
 - OMS, « La trypanosomiase africaine: lute et surveillance », Rapport d’un comité d’experts de l’OMS, Série de rapports techniques, Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 1998.
 - Opperdoes F., Baudhuin P., Coppens I., De Roe C., Edwards S., Weijers PJ., and Misset O., “Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*”, *The Journal of Cell Biology*, 98, 1178-1184, 1984.
 - Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O., Mezui-Me-Ndong J., Boda C., Maine I., Labrousse F., Bisser S., and 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, 427-436, 2006.
 - Owens T., Bechmann I., and Engelhardt B., “Perivascular spaces and two steps to neuroinflammation”, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67, 1113-1121, 2008.
 - Patterson S., Alphey M., Jones D., Shanks E., Street I., Frearson J., Wyatt P., Gilbert I., and Fairlamb A., “Dihydroquinazolines as a novel class of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase inhibitors: discovery, synthesis, and characterization of their binding mode by protein crystallography”, *Journal of Medicine Chemistry*, 54, 6514-6530, 2011.

- Penchenier L., Grébaud P., Njokou F., Eyenga V., and Büscher P., “Evaluation of LATEX/*T.b.gambiense* for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Central Africa”, *Acta Tropica*, 85, 31-37, 2003.
- Pentreath V., “Trypanosomiasis and the nervous system”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89, 9-15, 1994.
- Pépin J., and Meda H.A., “The epidemiology and control of Human African trypanosomiasis”, *Advances in Parasitology*, 49, 71-131, 2001.
- Phillips M., and Wang C., “A *Trypanosoma brucei* mutant resistant to α -difluoromethylornithine”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 22, 9-17, 1987.
- Phillips M., Coffino P., and Wang C., “Cloning and Sequencing of the Ornithine Decarboxylase Gene from *Trypanosoma brucei*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 8721-8727, 1987.
- Phillips M., Coffino P., and Wang C., “*Trypanosoma brucei* Ornithine Decarboxylase: Enzyme Purification, Characterization, and Expression *Escherichia coli*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 17933-17941, 1988.
- Poli P., De Mello M., Buschini A., Mortara A., De Albuquerque C., Da Silva S., Rossi C., and Zucchi T., “Cytotoxic and genotoxic effects of megalol, an anti-Chagas’ disease drug, assessed by different short-term tests”, *Biochemical Pharmacology*, 64, 1617-1627, 2002.
- Poltera A., Sayer P., Brighthouse G., Bovell D., and 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, 527-531, 1985.
- Poulin R., Lu L., Ackermann B., Bey P., and Pegg A., “Mechanism of the Irreversible Inactivation of Mouse Ornithine Decarboxylase by α -Difluoromethylornithine”, *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 150-158, 1992.
- Priotto G., Kasparian S., Mutombo W., Ngouama D., Ghorashian S., Arnold U., Ghabri S., Baudin E., Buard V., Kazardi-Kyanza S., Mutangala W., Pohlig G., Schmid C., Karunakara U., Torreele E., and Kande V., “Nifurtimox-efl ornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial”, *Lancet*, 374, 56-64, 2009.
- Raber G., Raber T., Raml R., Murko M., Magnes C., and Francesconi K., “Determination of the trypanocidal drug melarsoprol and its conversion products in biological fluids with HPLC–ICPMS/ESMS”, *Talanta*, 116, 876-881, 2013.

- Raivich G., and 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, 261-281, 2004.
- Rakesh K., and Agrawal D., ‘Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors”, *Biochemical Pharmacology*, 70, 649-657, 2005.
- Rechsteiner M., and Rogers SW., “PEST sequences and regulation by proteolysis”, *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 267-271, 1996.
- Redin G., Kuck N., and 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, 534-537, 1968.
- Rogers D., “Trypanosomiasis “risk” or “challenge””, *Acta Tropica*, 42, 5-23, 1985.
- Rotureau B., and Van Den Abbeele J., “Through the dark continent: African trypanosome development in the tsetse fly”, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 1-7, 2013.
- Sauvage F., Saint-Marcoux F., Duretz B., Deporte D., Lachatre G., and Marquet P., “Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry”, *Clinical Chemistry*, 52, 1735-1742, 2006.
- Schweingruber M., “The Melaminophenyl Arsenicals Melarsoprol and Melarsen Oxide Interfere with Thiamine Metabolism in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 3268-3271, 2004.
- Sekhar G., Watson C., Fidanboylyu M., Sanderson S., and Thomas S., “Delivery of antihuman African Trypanosomiasis drugs across the blood-brain and blood-CSF barriers”, *Advances in Pharmacology*, 71, 245-275, 2014.
- Shapiro T., and Englund P., “Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs”, *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 87, 950-954, 1990.
- Simarro P., Diarra A., Ruiz Postigo J., Franco J., and Jannin J., “The Human African Trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-009: the way forward”, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1007, 2011.
- Smith D., Pépin J., and Stich A., ‘Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis”, *British Medical Journal*, 341-355, 1998.
- Sternberg JM., Gierliński M., Biéler S., Ferguson MA., and Ndung'u JM., “Evaluation of the diagnostic accuracy of prototype rapid tests for human African trypanosomiasis”, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e3373, 2014.

- Stevens J., and Brisse S., “Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance”, dans *The trypanosomiase*, de Holmes I., Miles P.H., Maudlin M.A., 1-23, Wallingford: CABI Publishing, 2004.
- Stijlemans B., Guillems M., Raes G., Beschim A., Magez S., and De Baetselier P., “African trypanosomiasis: from immune escape and immunopathology to immune intervention”, *Veterinary Parasitology*, 148, 3-13, 2007.
- Sutcliffe CB., Skellern G., Araya F., Cannavan A., Sasanya JJ., Dungu B., Van Gool F., Münstermann S., and Mattioli RC., “Animal trypanosomosis: making quality control of trypanocidal drugs possible,” *Revue Scientifique et Technique*, 33, 813-30, 2004.
- Take Y., Inouye Y., Nakamura S., Allaudeen H., and 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*, 42, 107-115, 1989.
- Tarral A., Blesson S., Valverde Mordt O., Torreele E., Sassella D., Bray M.A., Hovsepian L., Evène E., Gualano V., Felices M., and Strub-Wourgaft N., “Determination of an optimal dosing regimen for Fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of Human African trypanosomiasis: First-in-Human studies,” *Clinical Pharmacokinetics*, 53, 565-580, 2014.
- Tiberti N., Hainar A., and Sanchez JC., “Translation of human African trypanosomiasis biomarkers towards field application”, *Elsevier*, 1, 12-24, 2013.
- Torreele E., Bourdin Trunz B., Tweats D., Kaiser M., Brun R., Mazué G., Bray M., and Pécoul B., “Fexinidazole: A new oral Nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, e923, 2010.
- Turrens JF., Watts BP., Zhong L., and Docampo R., “Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 82, 125-9, 1996.
- Tweats D., Bourdin Trunz B., and Torreele E., “Genotoxicity profile of fexinidazole a drug candidate in clinical development for human African trypanosomiasis (sleeping sickness)”, *Mutagenesis*, 27, 523-532, 2012.
- Vaidya T., Bakhiet M., Hill K., Olsson T., Kristensson K., and Donelson J., “The gene for a T lymphocyte triggering factor from African trypanosomes”, *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 433-438, 1997.

- Van Schaftingen E., Opperdoes F., and Hers HG., “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*”, *European Journal of Biochemistry*, 166, 653-661, 1987.
- Vickerman K., Tetley L., Hendry K., and Turner C.M., “Biology of African trypanosomes in the tsetse fly, *Biology of the Cell*, 64, 109-119, 1988.
- Vickerman K., “Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes”, *British Medical Bulletin*, 41, 105-114, 1985.
- Viode C., Bettache N., Cenas N., Krauth-Siegel L., Chauvière G., Bakalara N., and Périé J., “Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles”, *Biochemical Pharmacology*, 57, 549-557, 1999.
- Viode C., Albuquerque C., Chauvière G., Houee-Levin C., and Périé J., « Comparative study by pulse radiolysis of the radical anion derived from compounds used in Chagas’ disease therapy,” *New Journal of Chemistry*, 21, 1331-1338, 1997.
- Walton J., Jones D., Kiuru P., Durie A., Westwood N., and Fairlamb A., “Synthesis and evaluation of indatraline-based inhibitors for Trypanothione Reductase”, *ChemMedChem*, 6, 321-328, 2011.
- Watanabe M., Nishino T., Takio K., Sofuni T., and Nohmi T., “Purification and characterization of wild-type and mutant “classical” nitroreductases of *Salmonella typhimurium*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 23922-23928, 1998.
- Welburn D., Picozzi K., Fèvre E., Coleman P., Odiit M., and Carrington, “Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum resistance associated (SRA) gene”, *The Lancet*, 358, 2017-2019, 2001.
- Wenzler T., Yang S., Patrick D., Braissant O., Ismail M., Tidwell R., Boykin D., Wang M., and Brun R., “In Vitro and In Vivo Evaluation of 28DAP010, a Novel Diamidine for Treatment of Second-Stage African Sleeping Sickness”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 4452-4463, 2014.
- Winkelmann E., Raether W., Gebert U., and Sinharay A., “Chemotherapeutically active nitro compounds. 4.5-nitroimidazoles , Part I”, *Arzneimittelforschung*, 27, 2251-2263, 1977.
- Wrighton SA., and Stevens JC., “The human hepatic cytochromes P40 involved in drug metabolism,” *Critical Reviews in Toxicology*, 22, 1-21, 1992.

Site WEB:

- Photo Glossine:

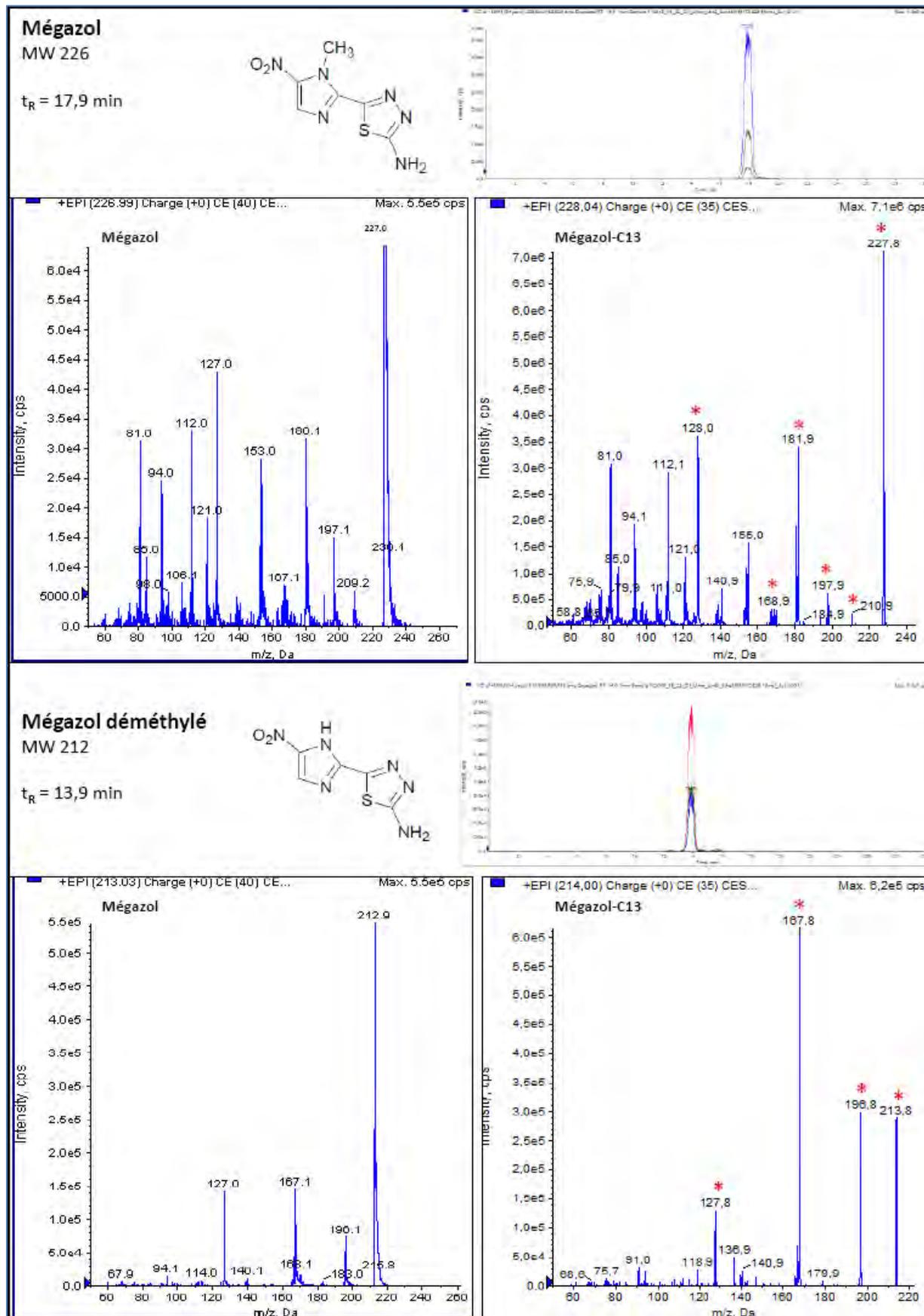
http://raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/Tsetse_Fly.html

- Principe de MRM:

<http://www.cgfb.u-bordeaux2.fr/fr/content/la-protéomique-quantitative-ciblée>

Annexes

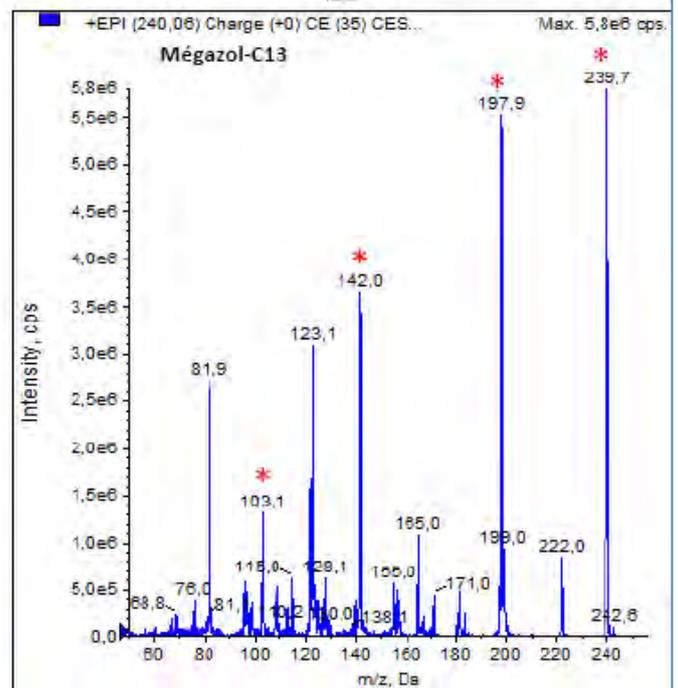
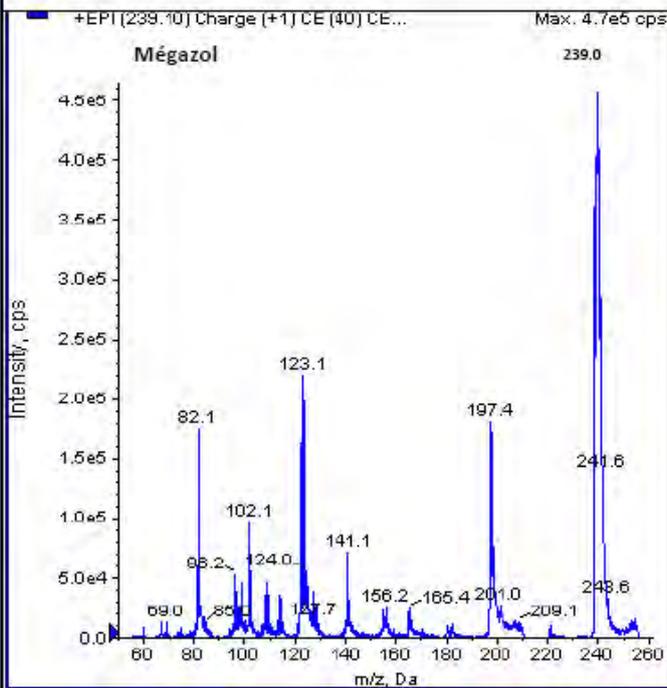
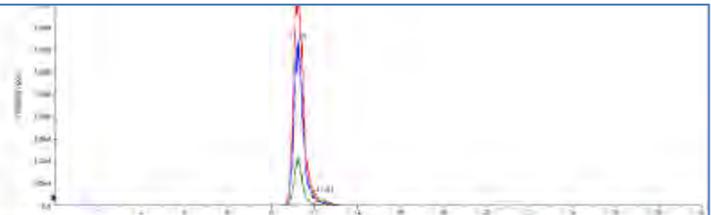
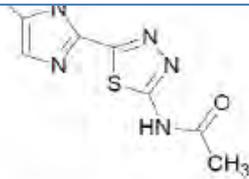
Annexe 1 : Synthèse récapitulative des spectres MS/MS de tous les ions détectés (les ions contenant le ^{13}C sont indiqués par une étoile rouge)



Mégazol Acétylé

MW 238

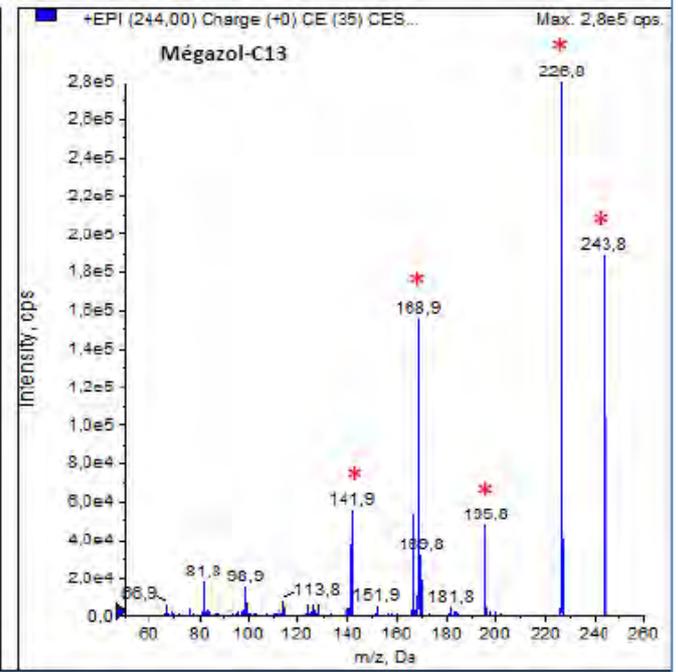
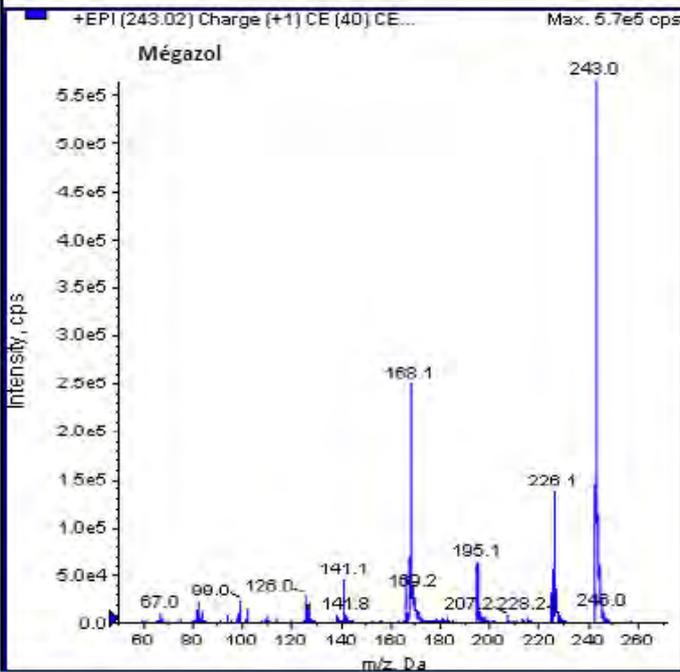
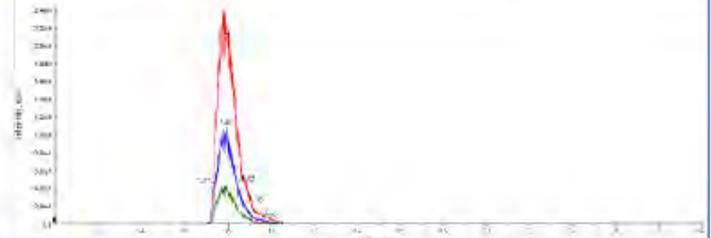
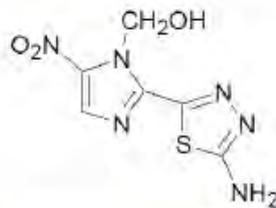
$t_R = 11,2$ min



Hydroxy-mégazol

MW 242

$t_R = 7,9$ min

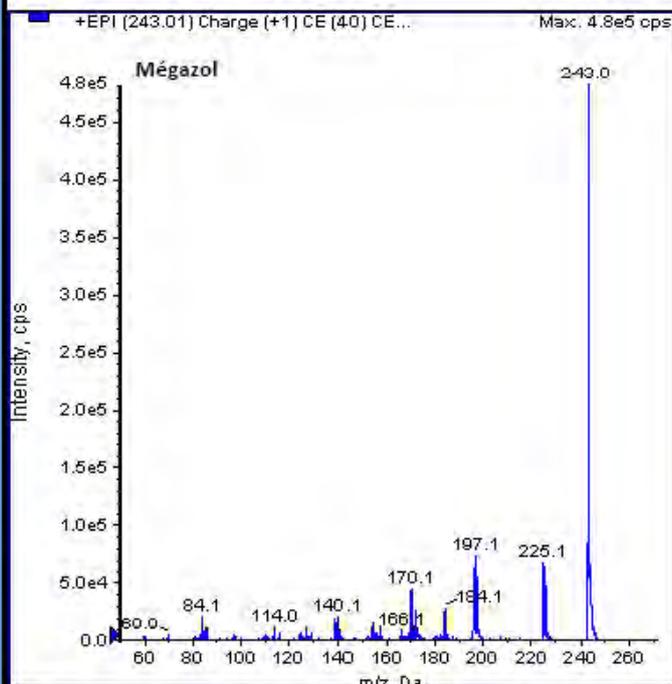
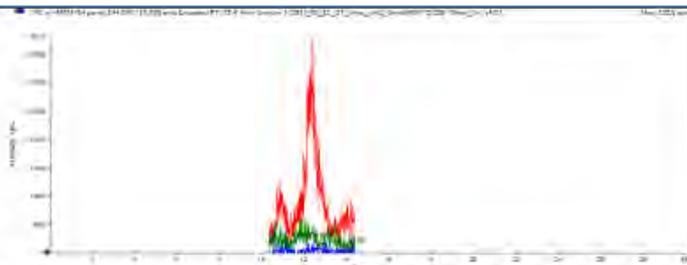
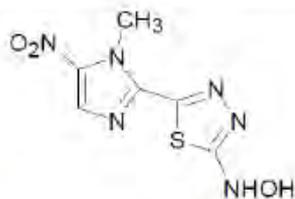


Hydroxylamine

Mégazol

MW 242

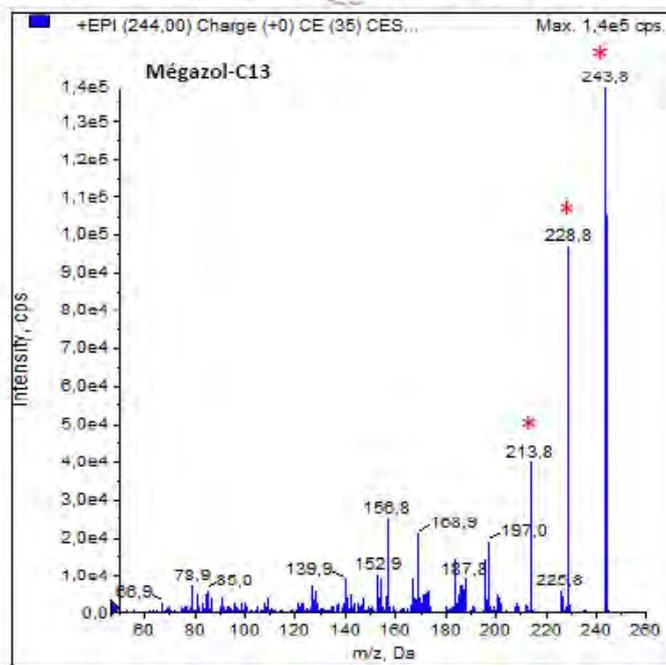
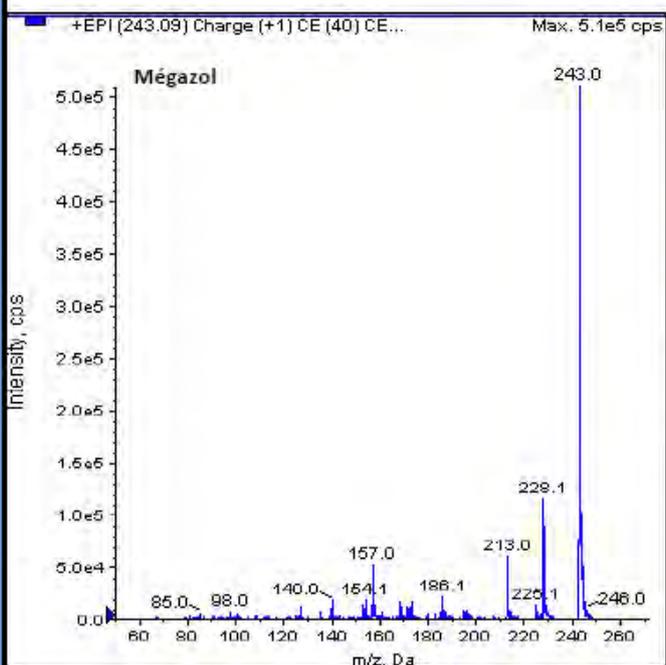
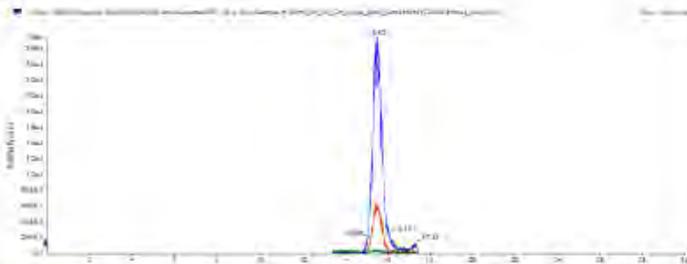
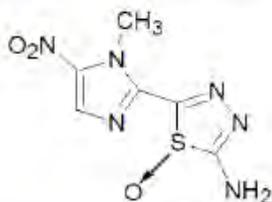
$t_R = 12,4$ min



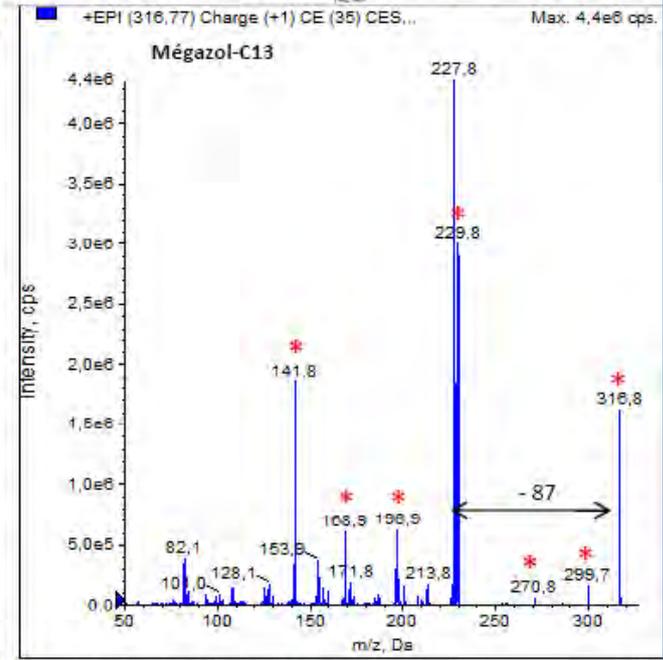
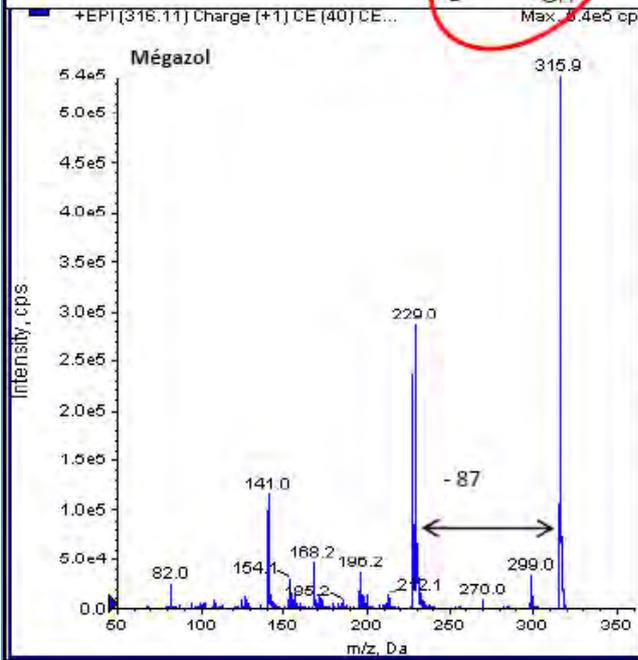
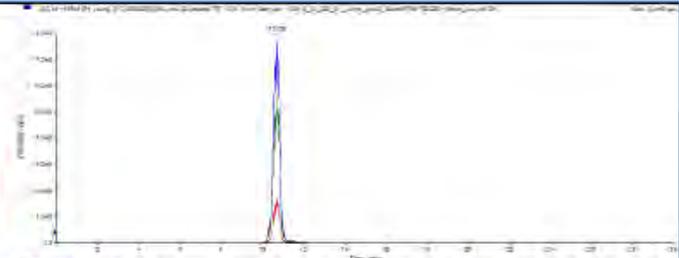
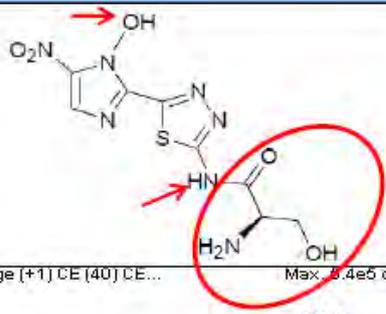
Sulfoxy-mégazol

MW 242

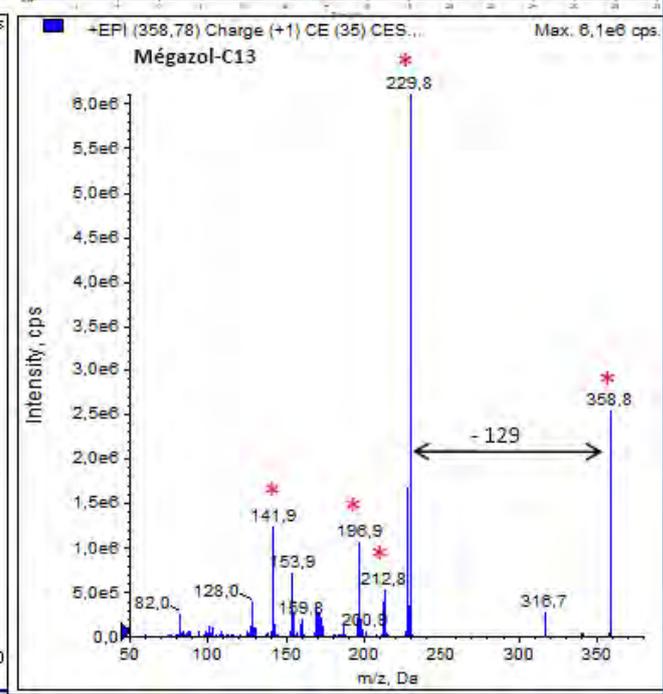
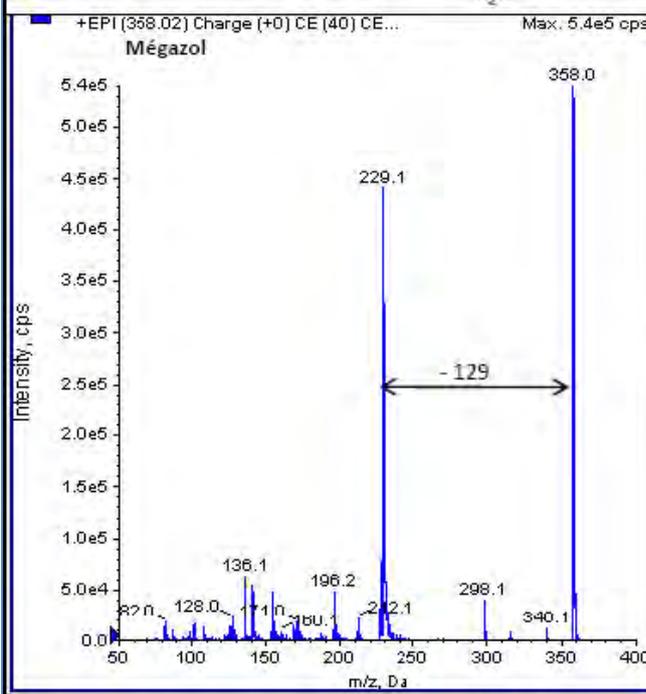
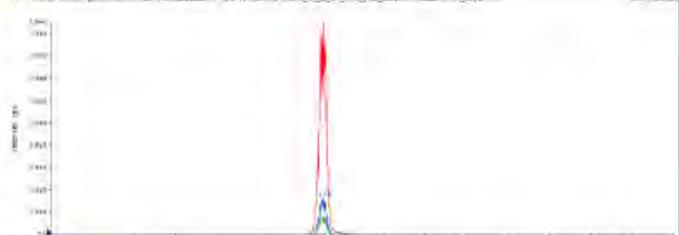
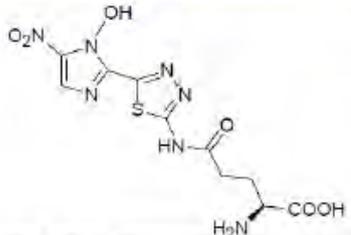
$t_R = 15,4$ min



MW 315
 $t_R = 10,6$ min

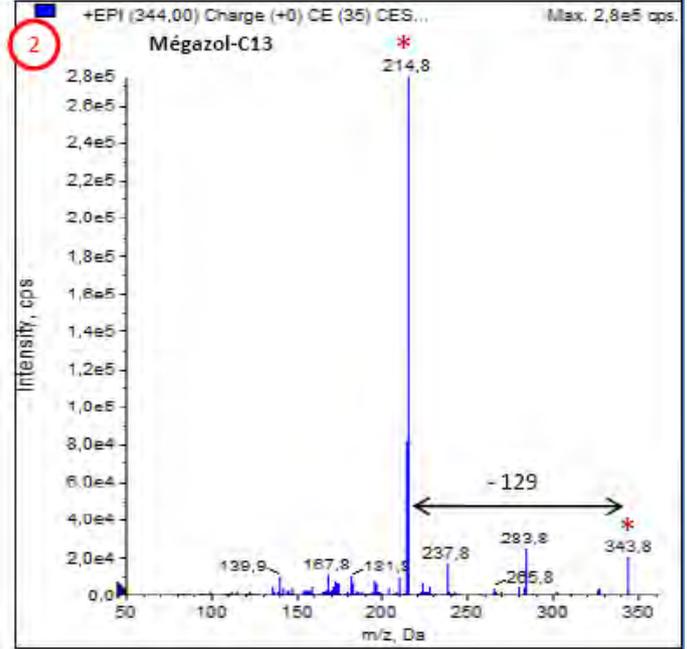
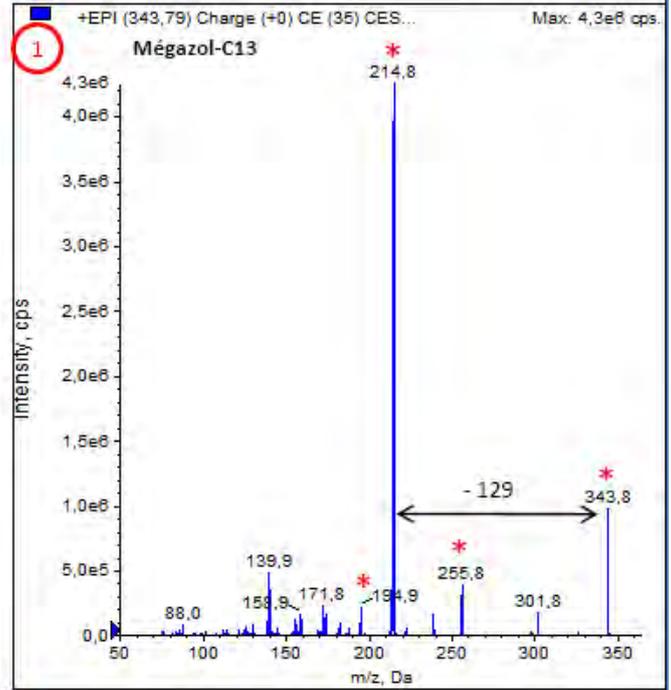
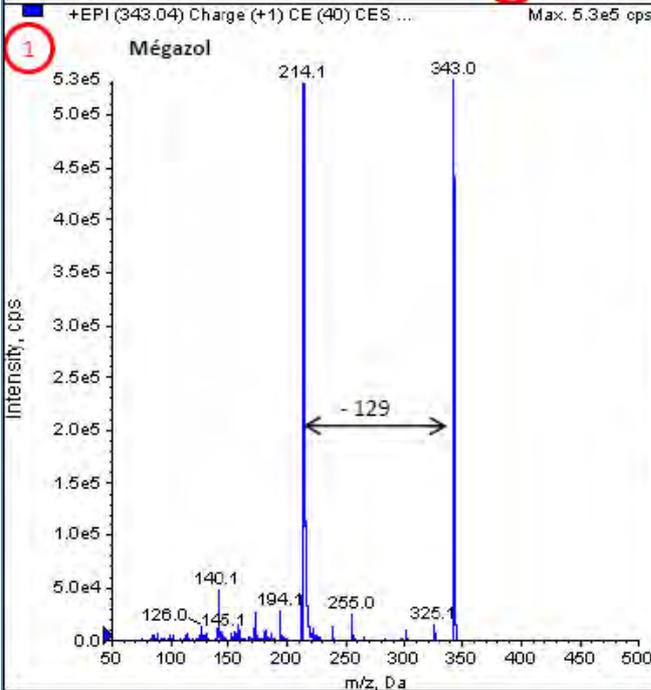
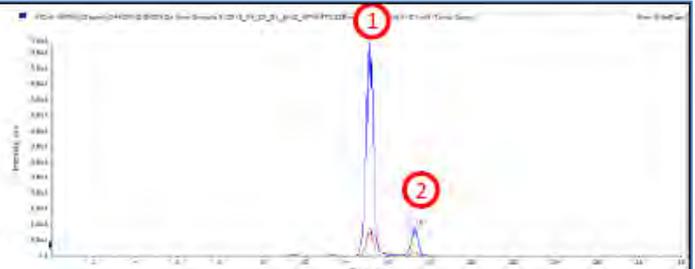
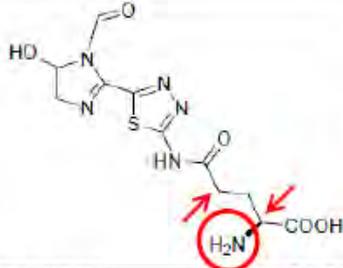


MW 357
 $t_R = 10,6$ min



MW 342

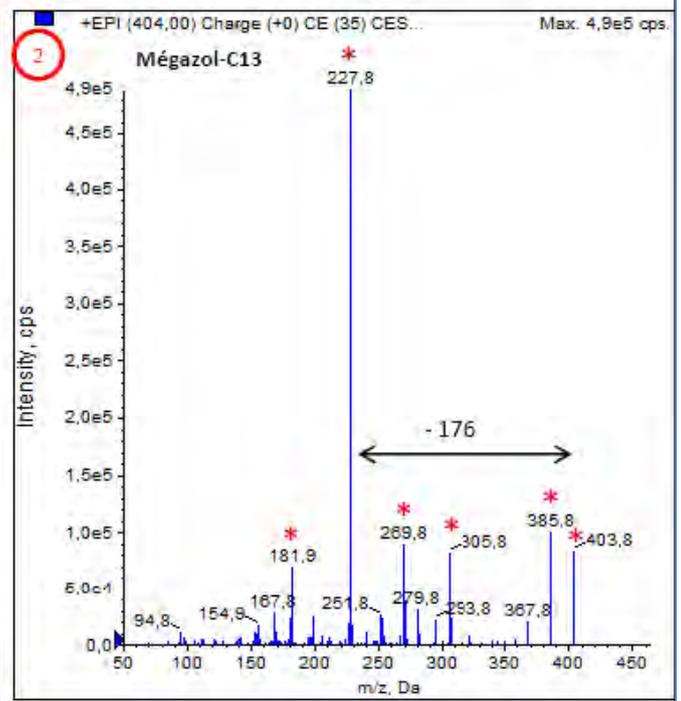
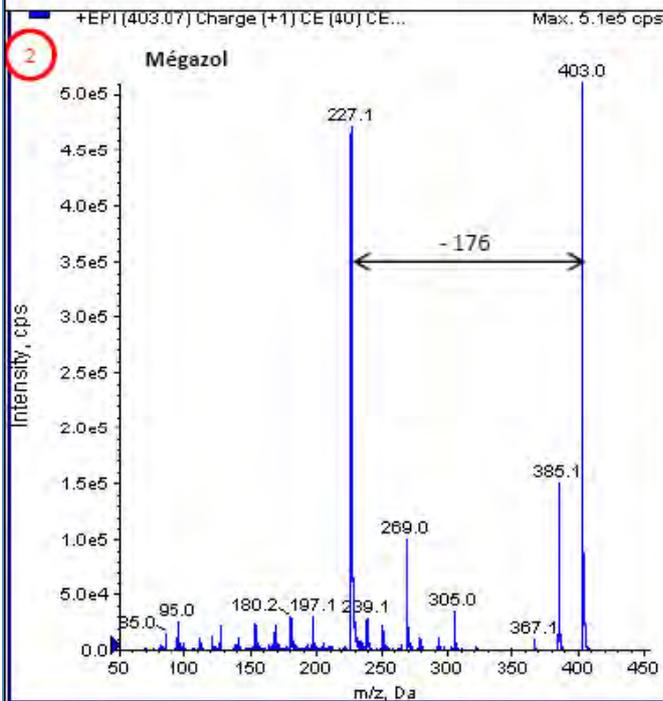
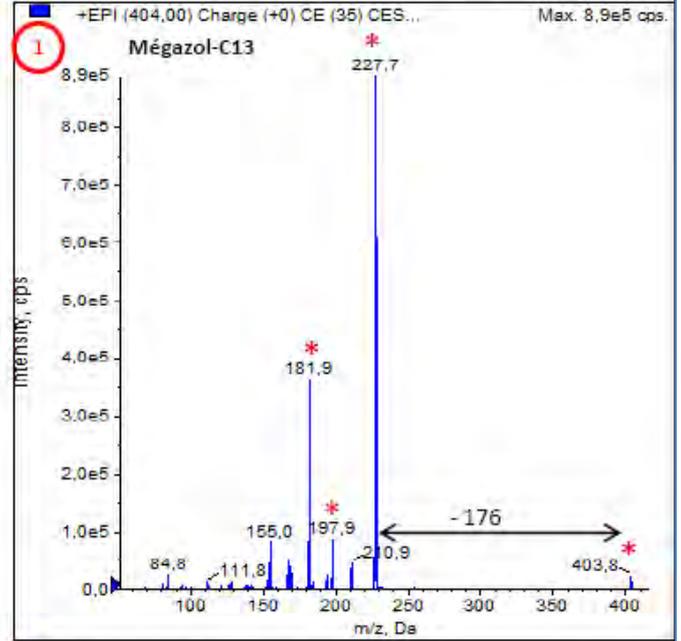
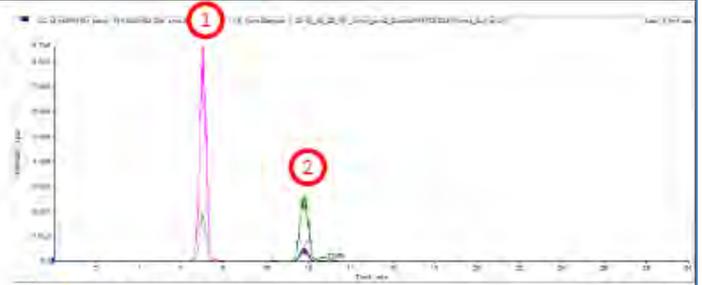
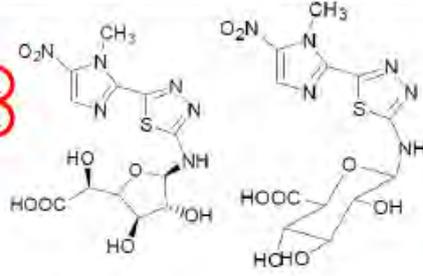
$t_R = 15,2 \text{ min}$ (1)
 $t_R = 17,2 \text{ min}$ (2)



MW 402

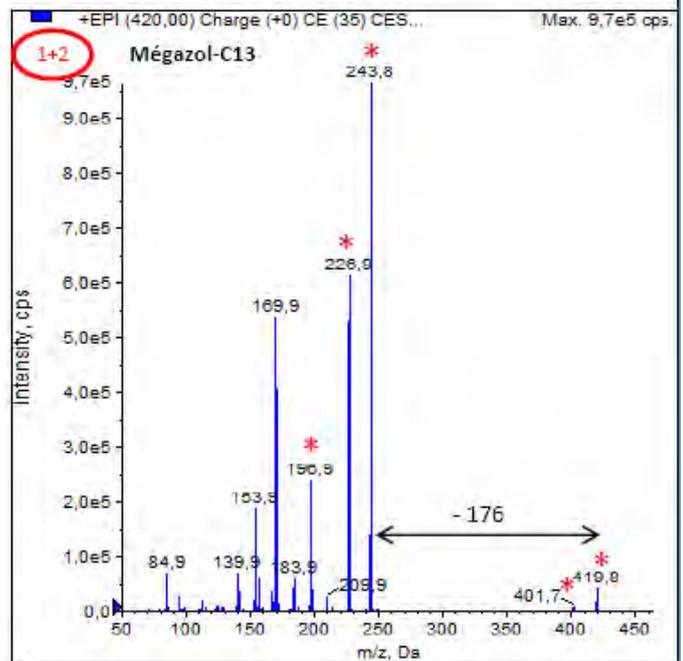
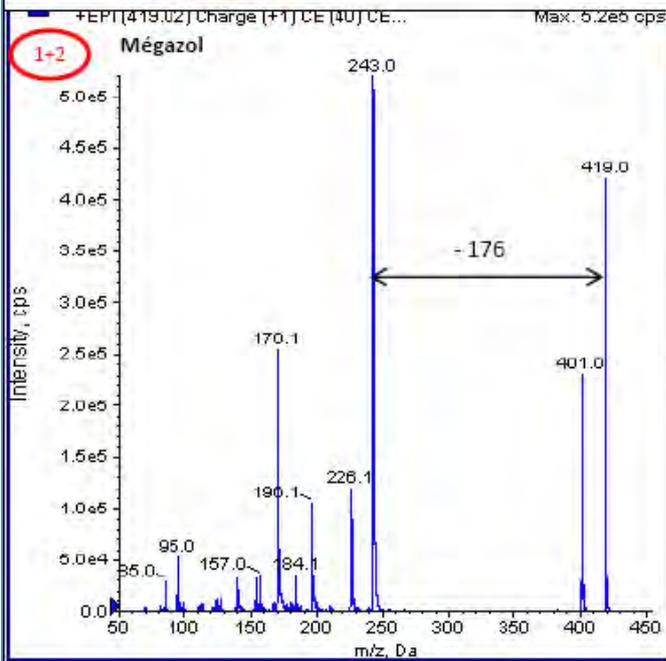
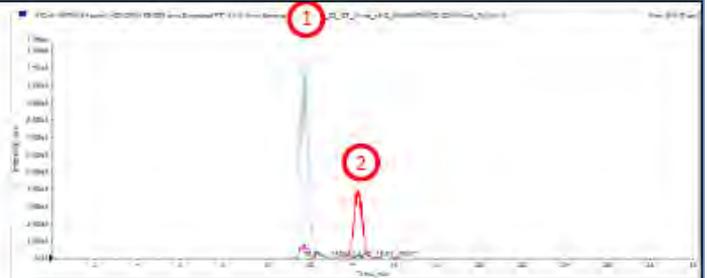
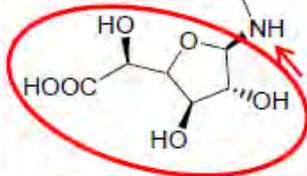
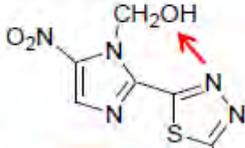
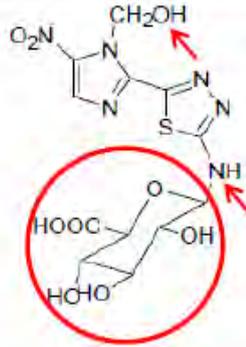
$t_R = 6,9 \text{ min}$ (1)

$t_R = 11,8 \text{ min}$ (2)



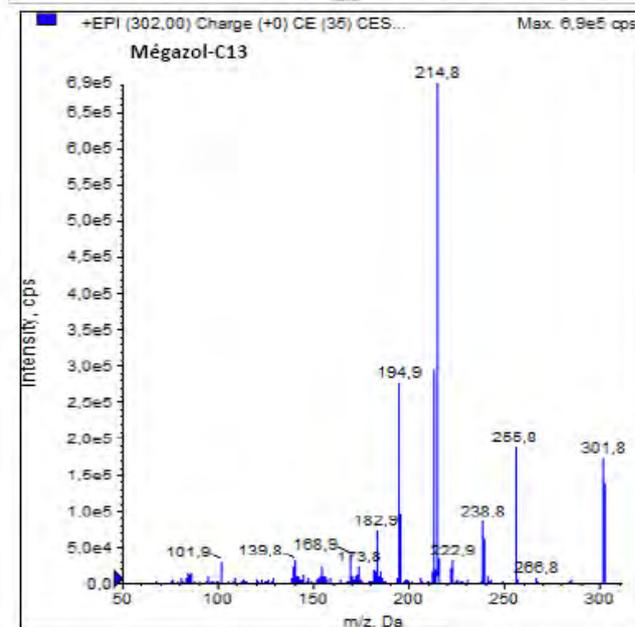
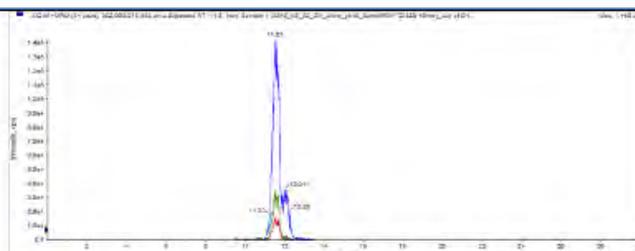
MW 418

$t_R = 11,7 \text{ min}$ (1)
 $t_R = 14,4 \text{ min}$ (2)



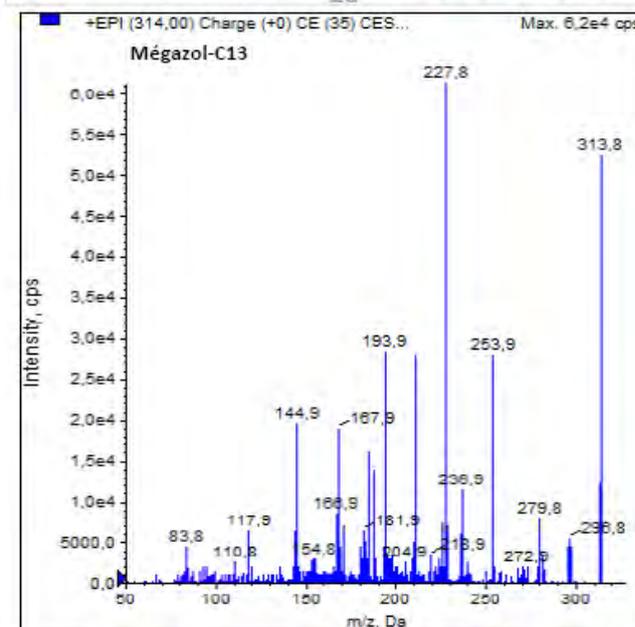
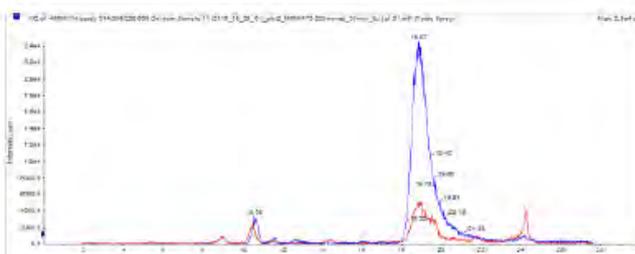
MW 300

$t_R = 11,6$ min



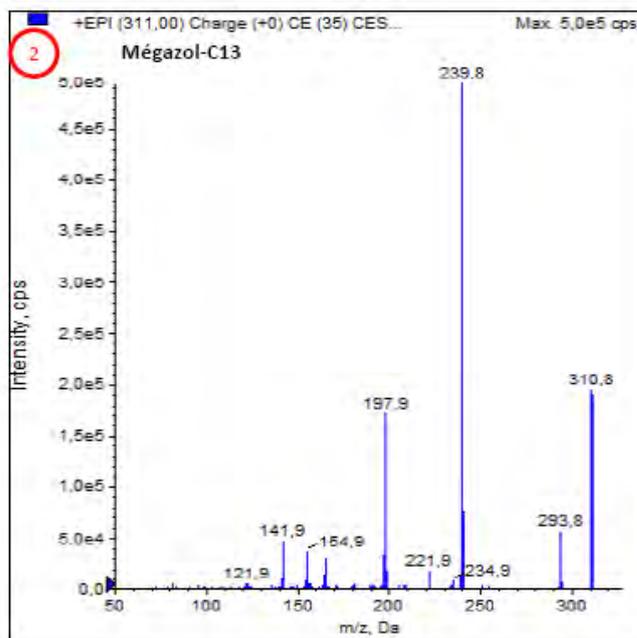
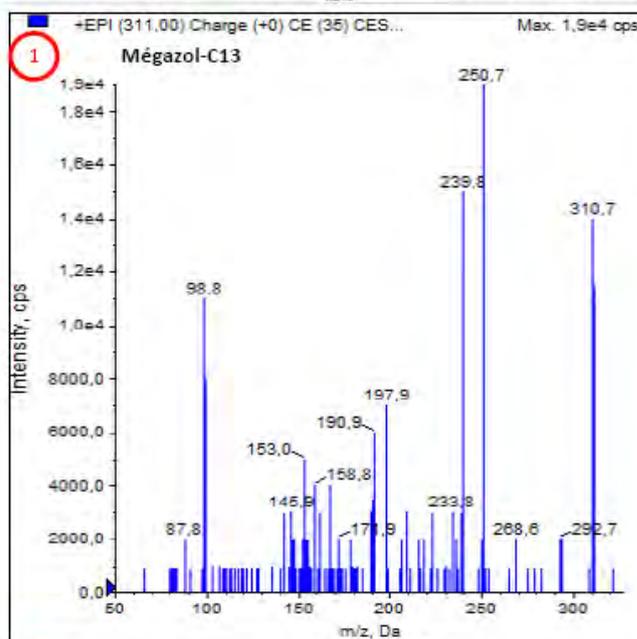
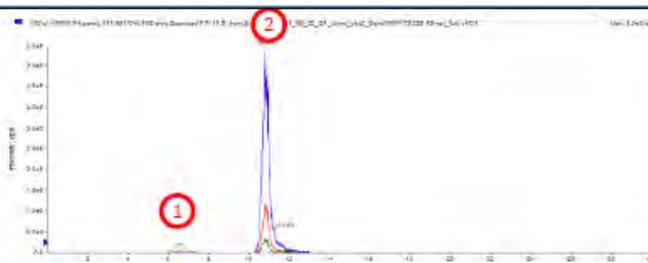
MW 312

$t_R = 18,9$ min

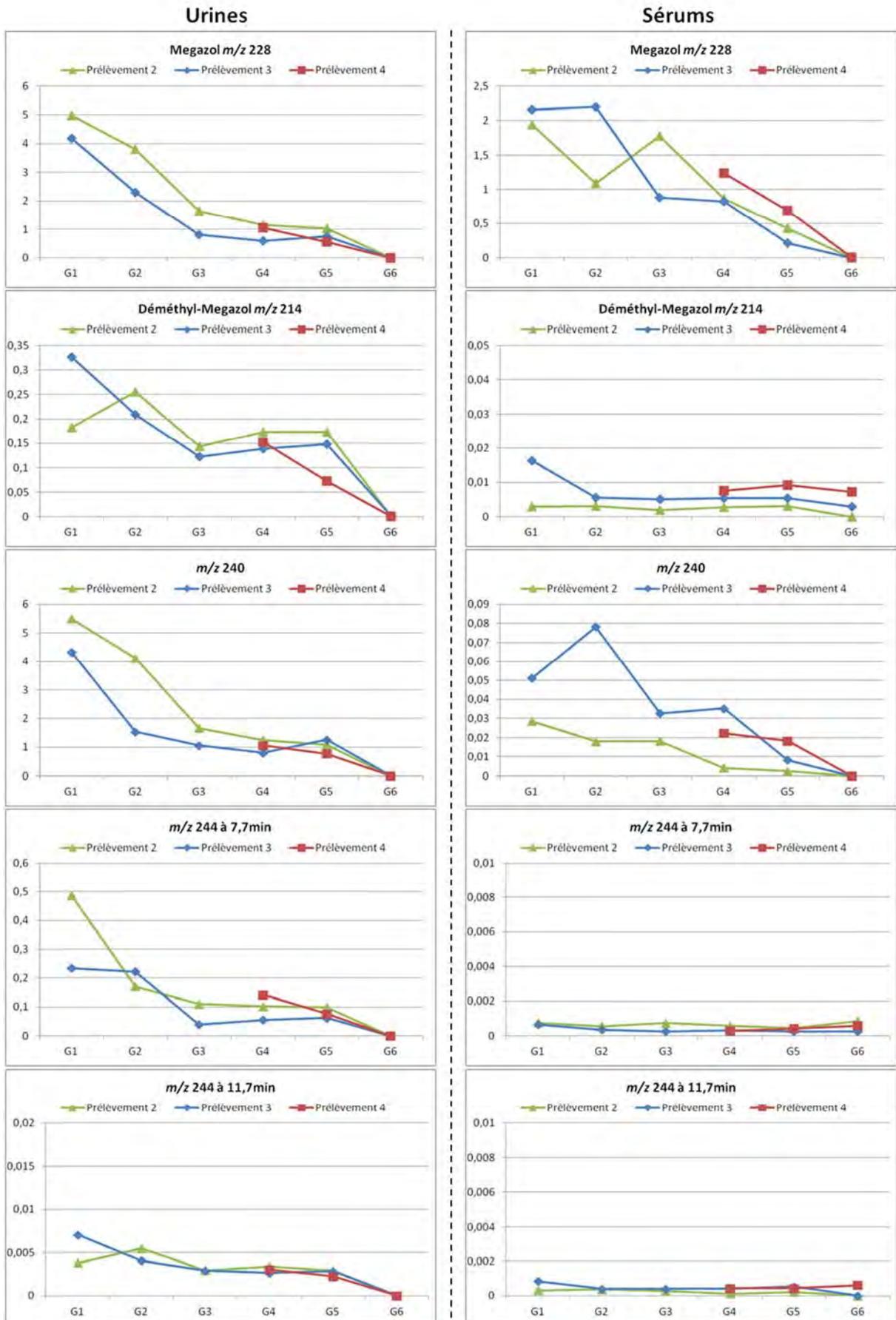


MW 309

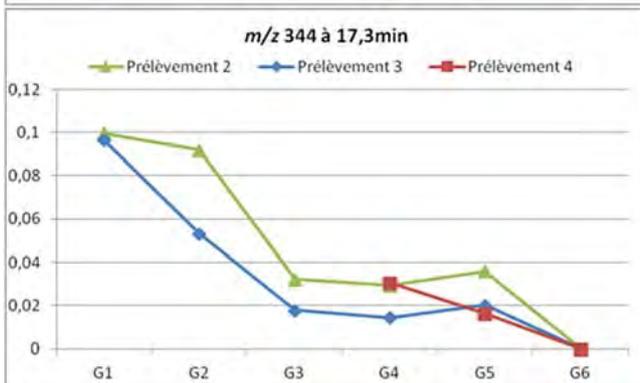
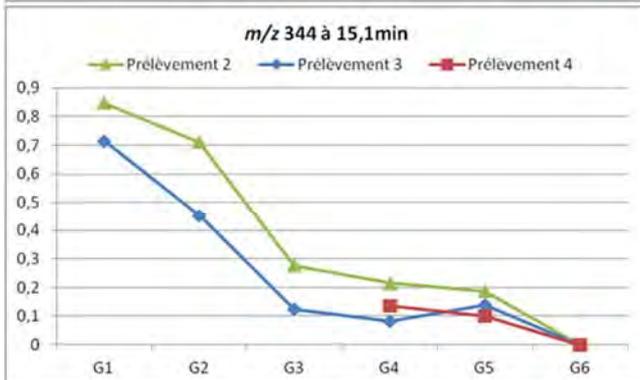
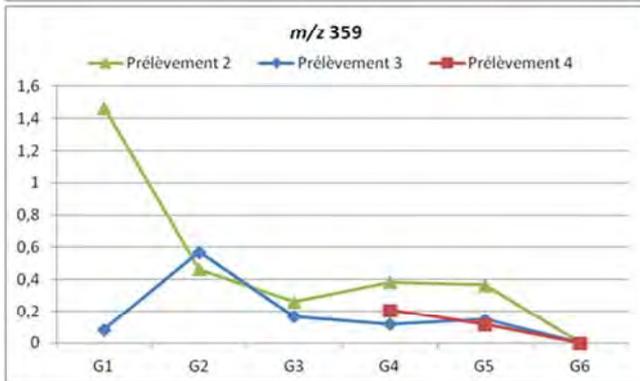
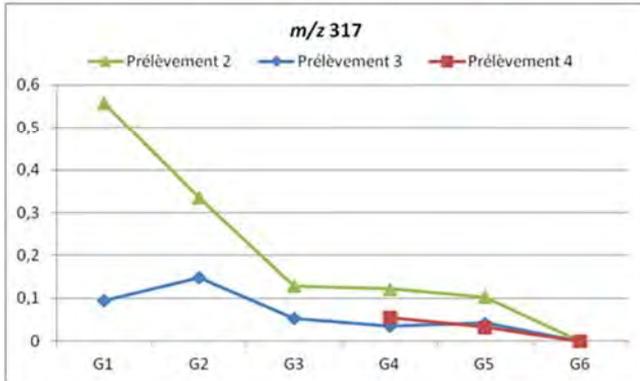
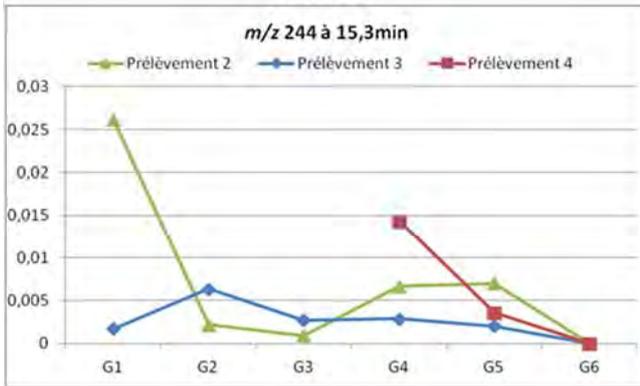
$t_R = 6,5 \text{ min}$ ①
 $t_R = 10,7 \text{ min}$ ②



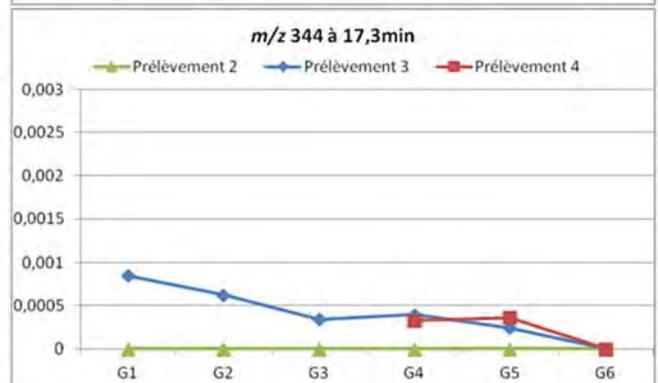
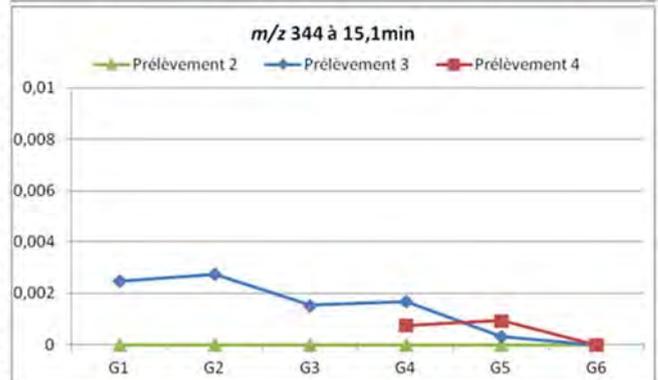
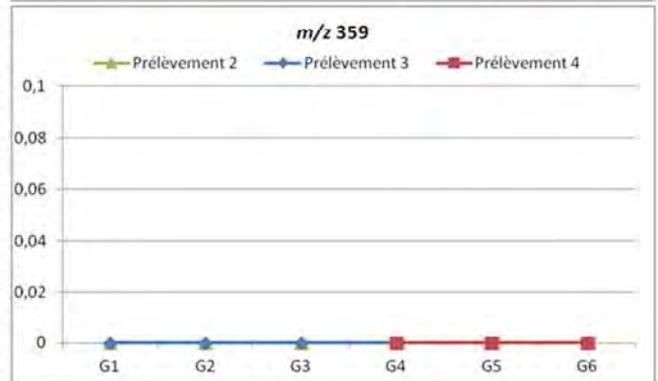
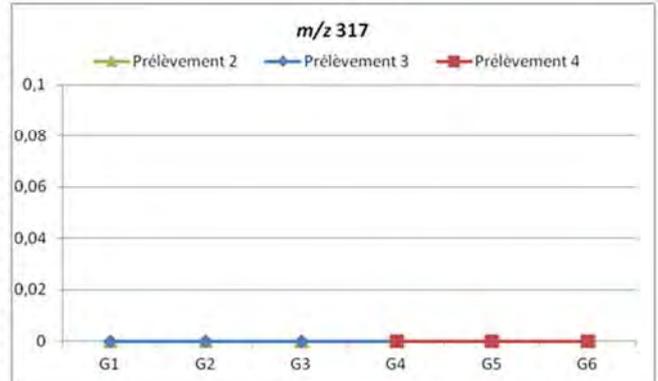
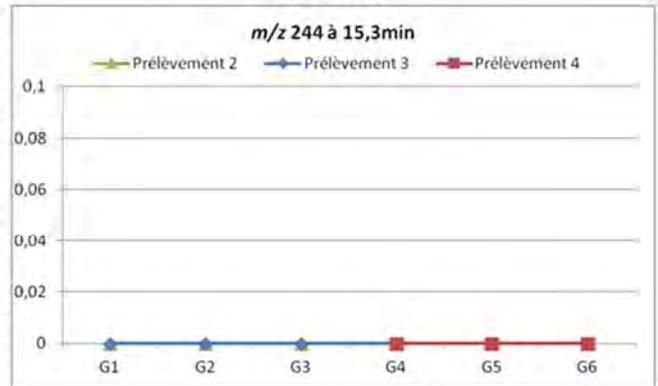
Annexe 2 : Comparaison des rapports analyte/SI entre urine et sérum pour chaque lot aux différents prélèvements pour G1 à G6



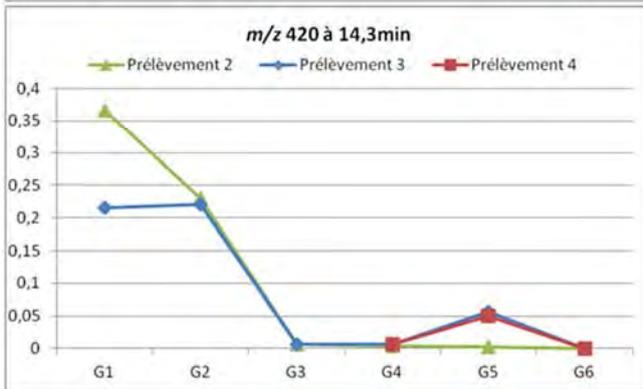
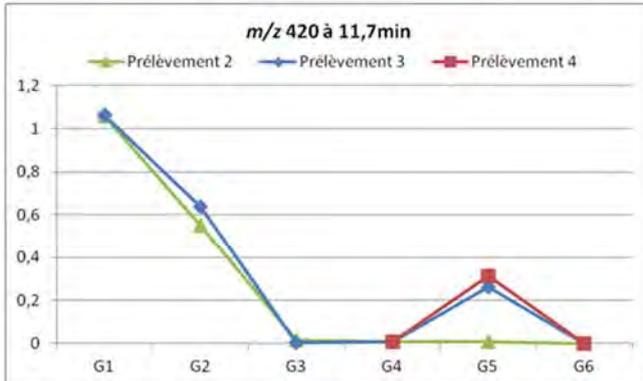
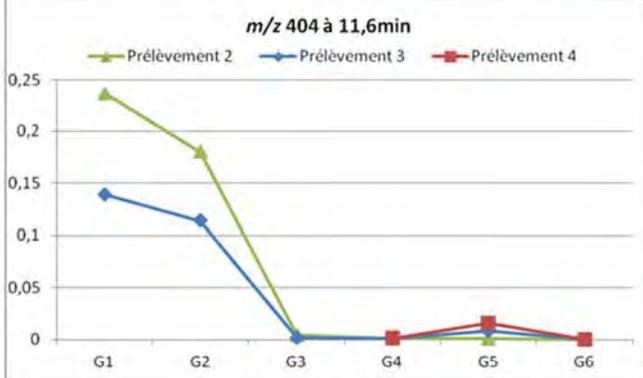
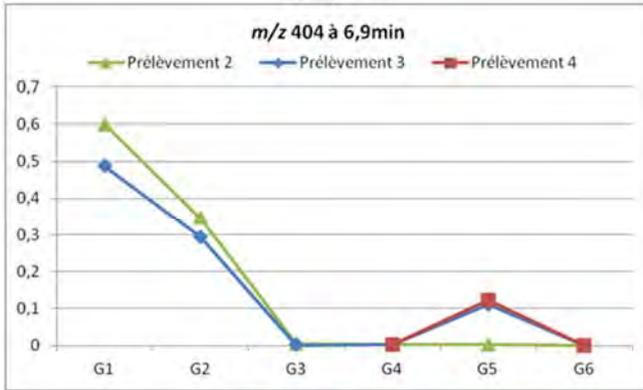
Urines



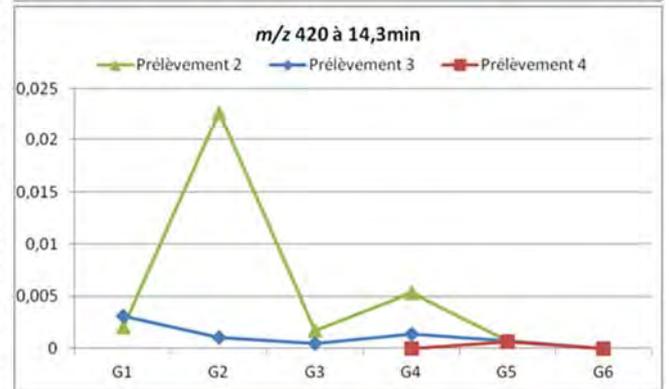
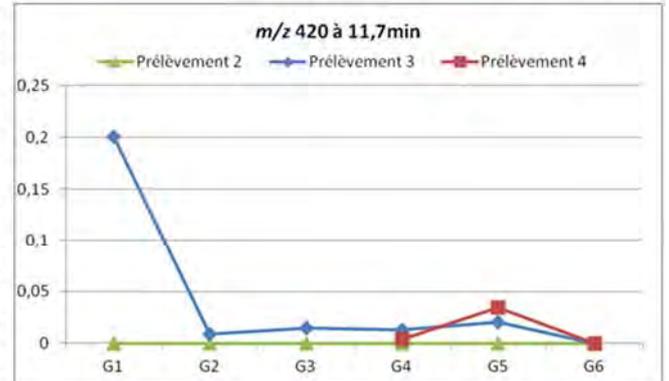
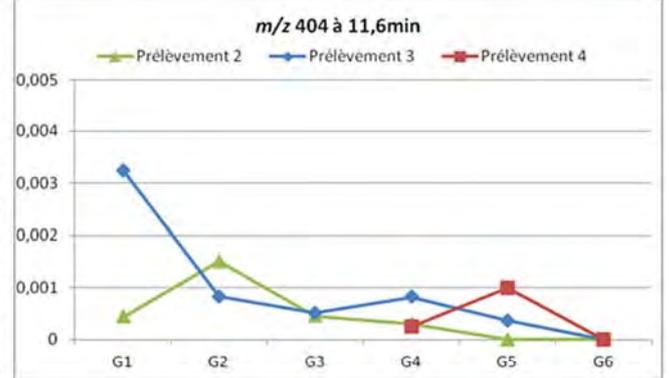
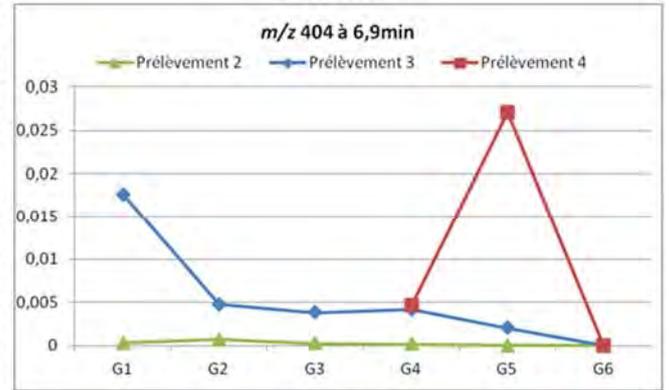
Sérums



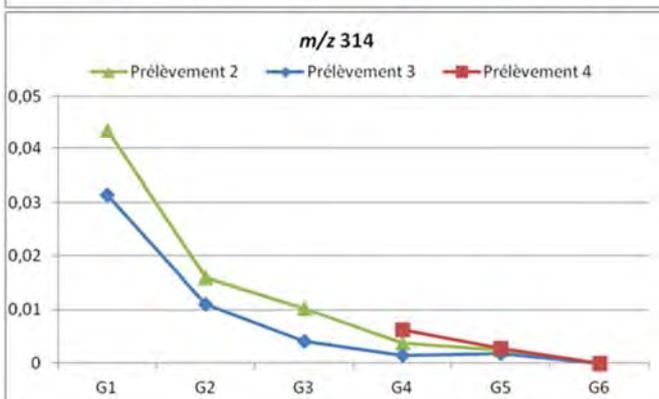
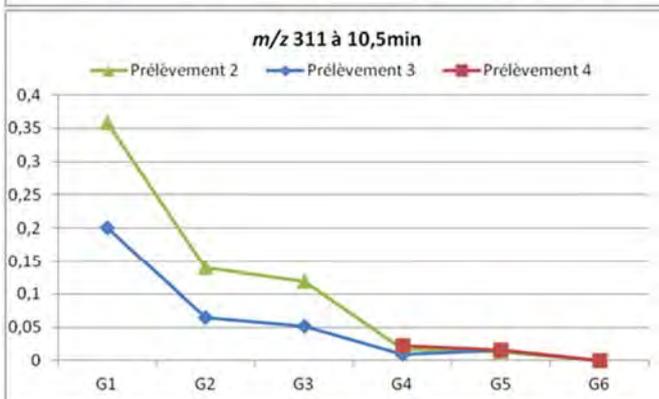
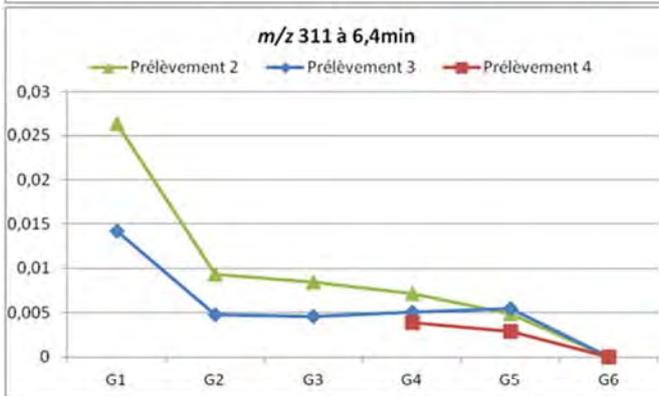
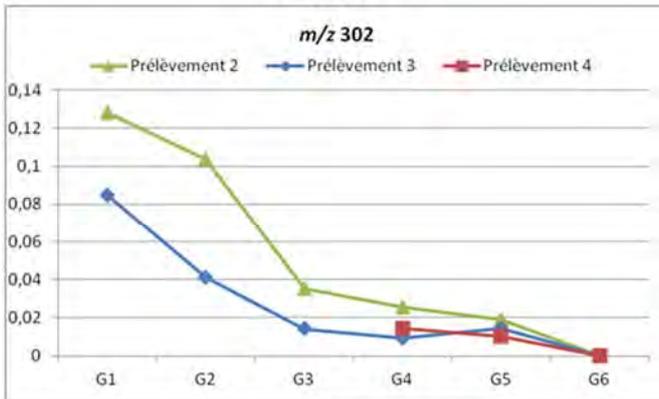
Urines



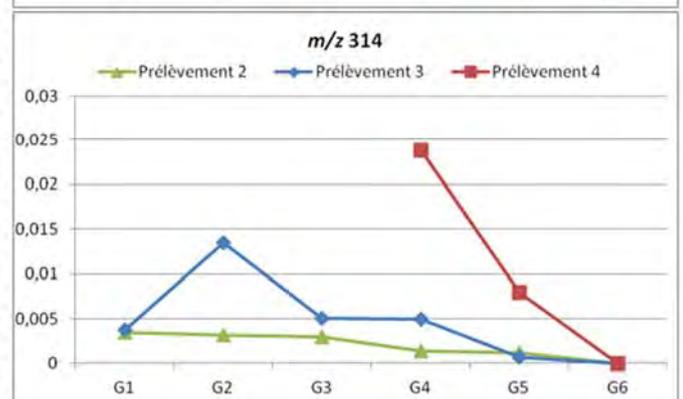
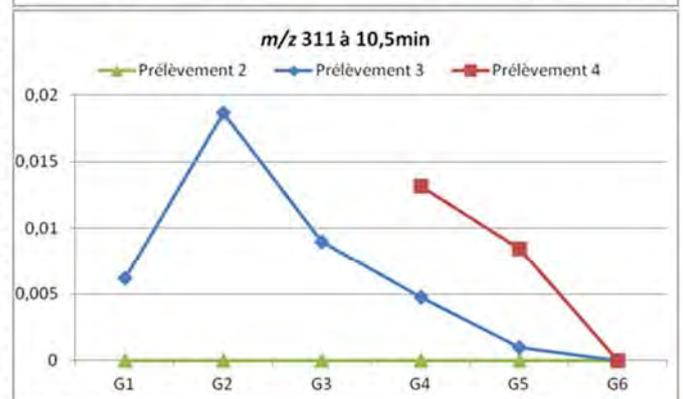
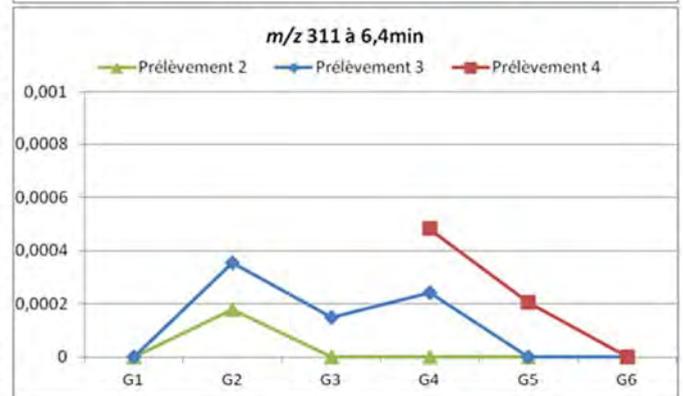
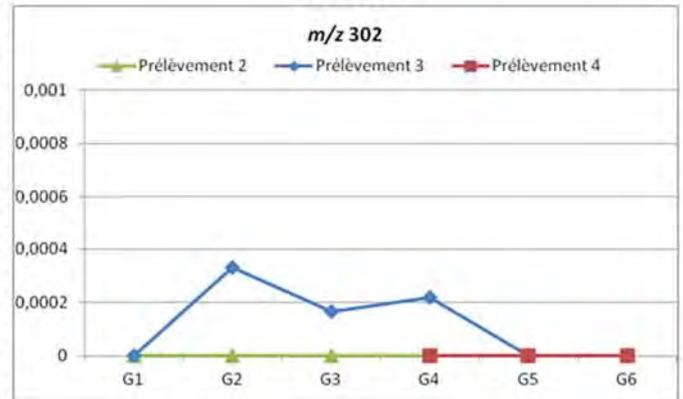
Sérums



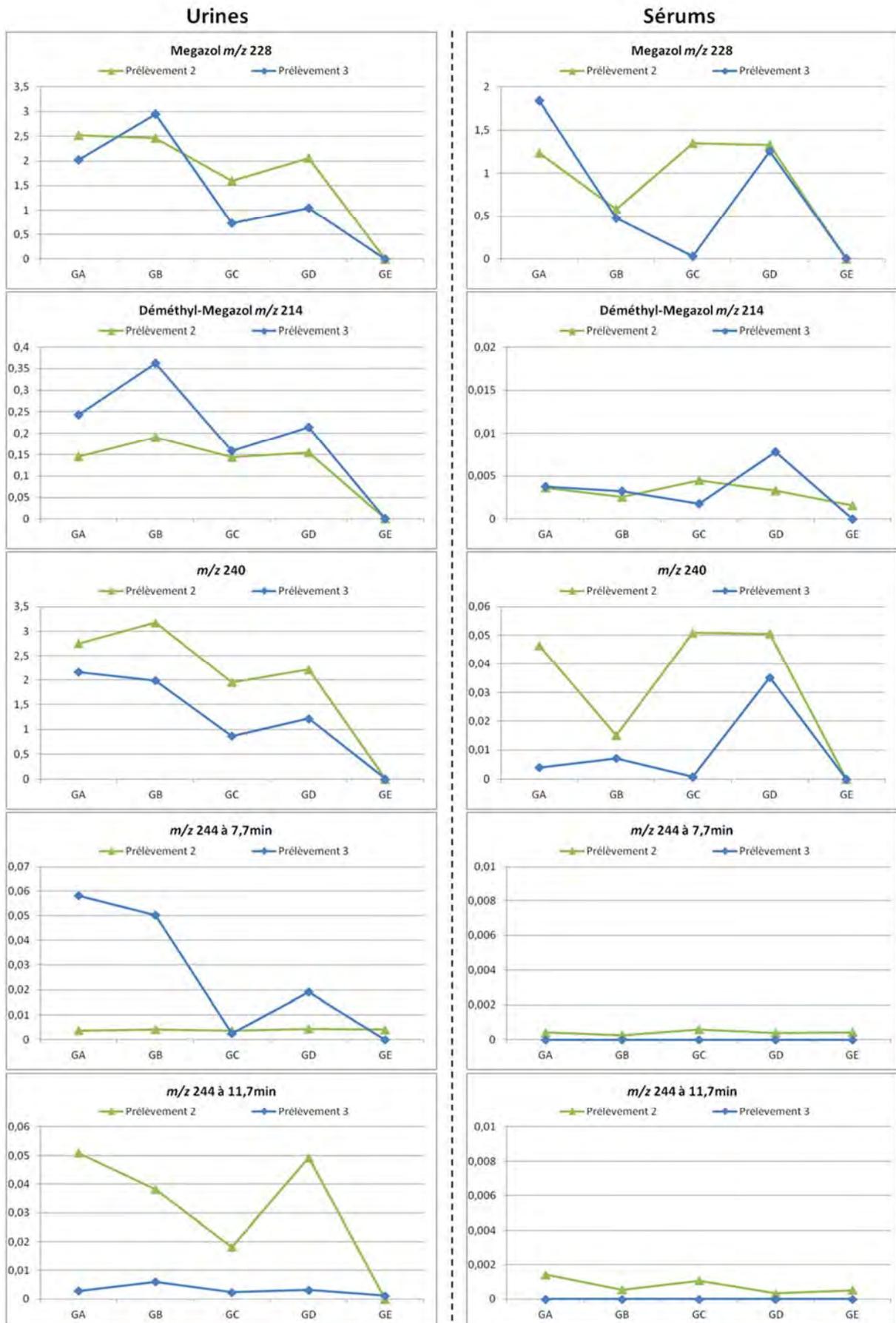
Urines



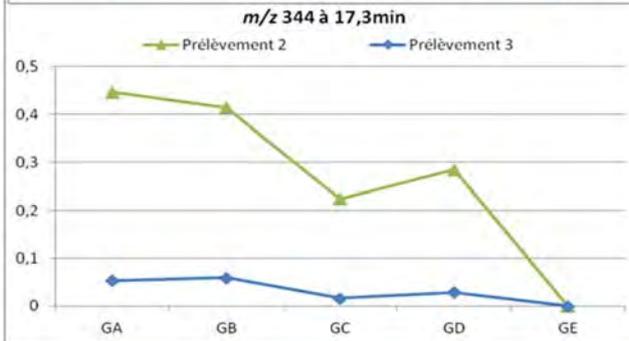
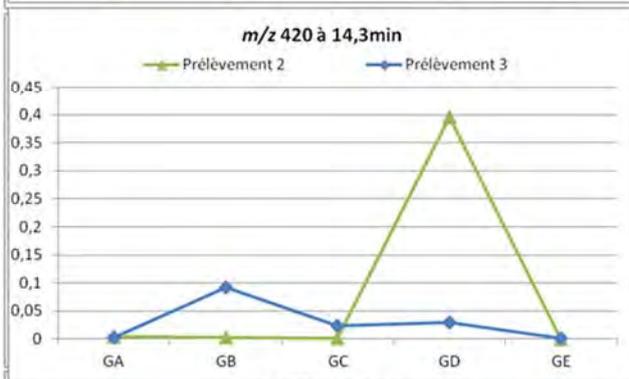
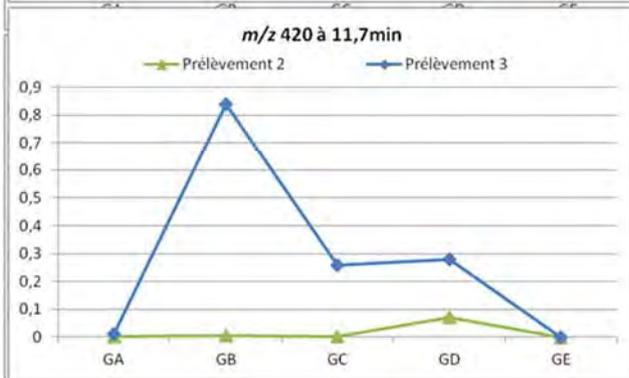
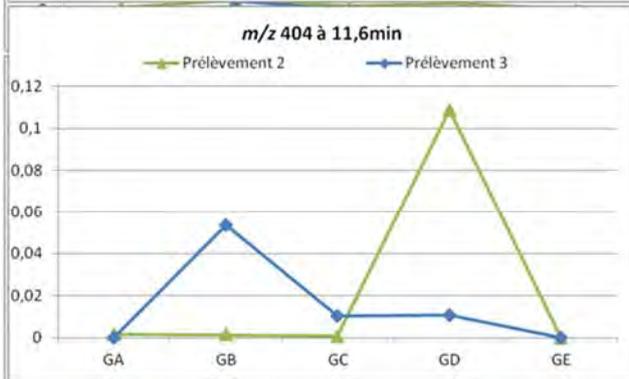
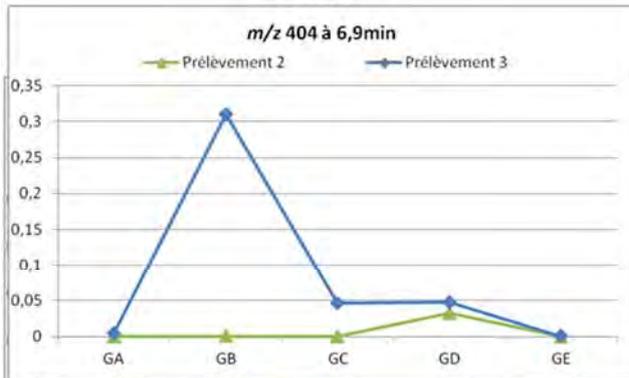
Sérums



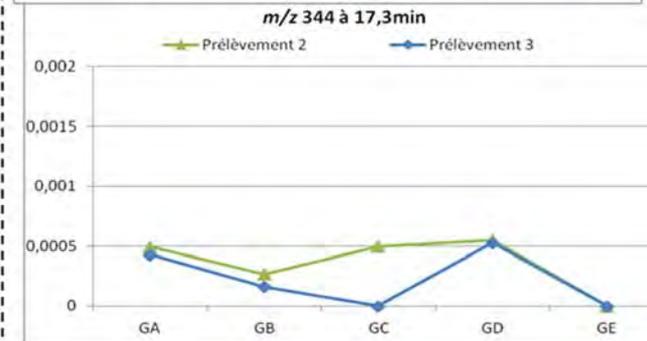
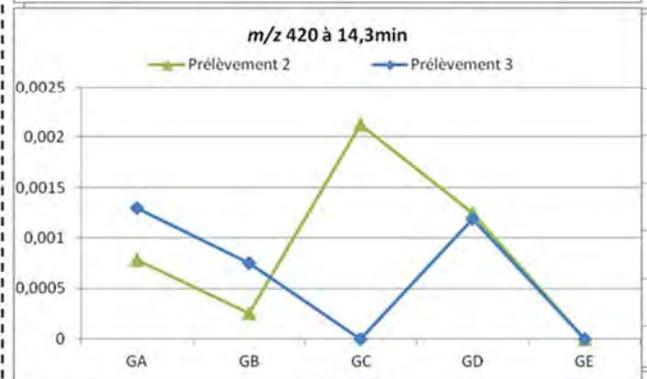
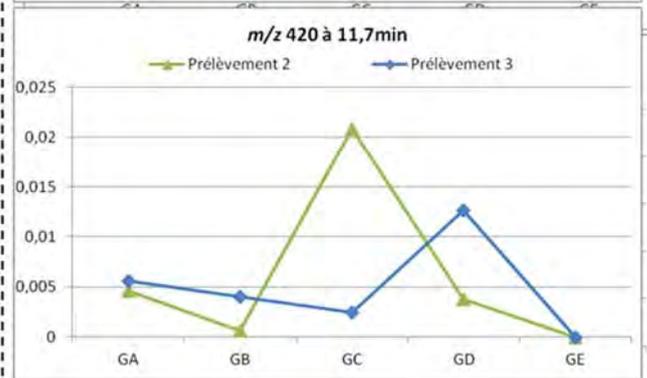
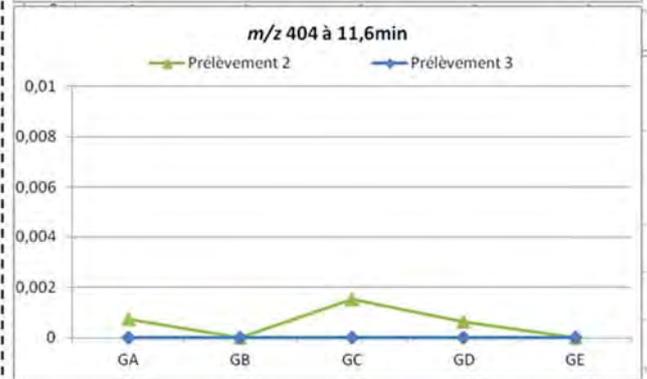
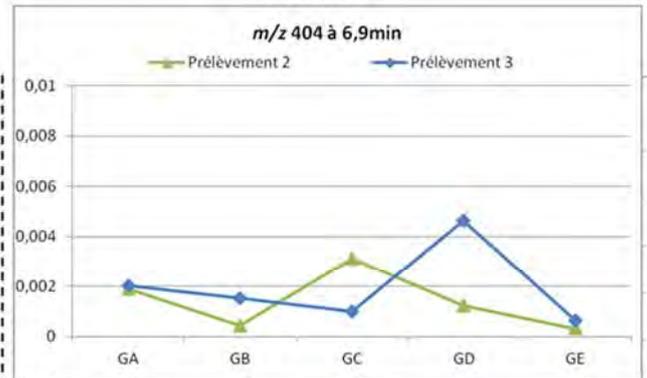
Annexe 3 : Comparaison des rapports analyte/SI entre urine et sérum pour chaque lot aux différents prélèvements pour GA à GE



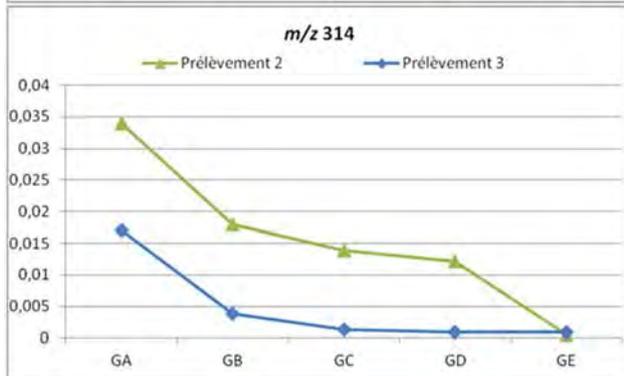
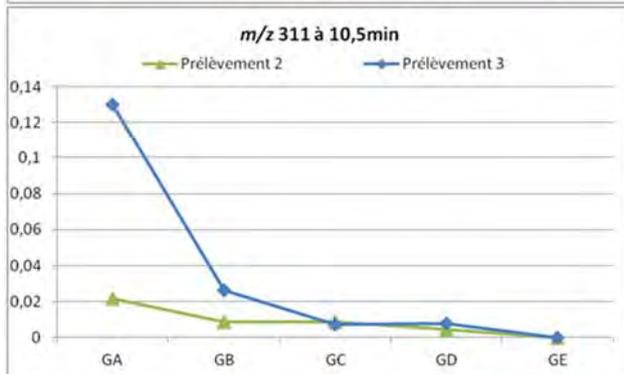
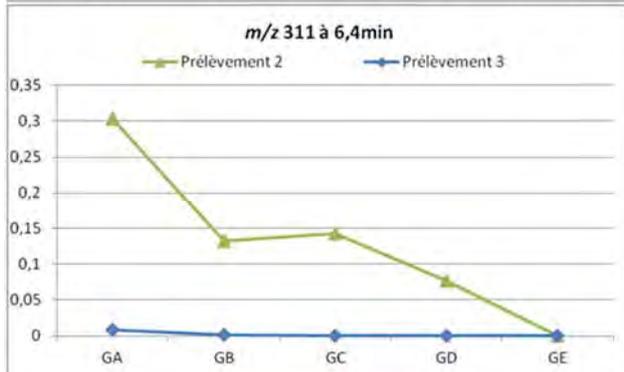
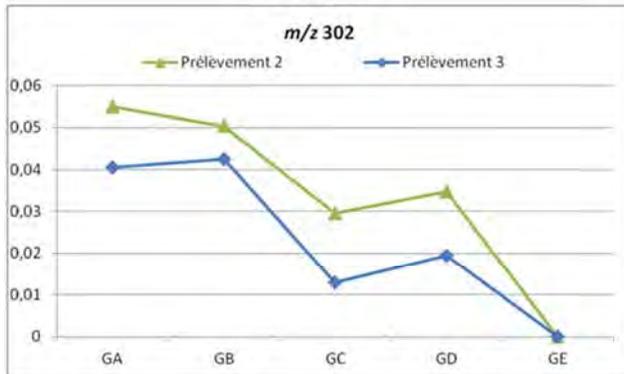
Urines



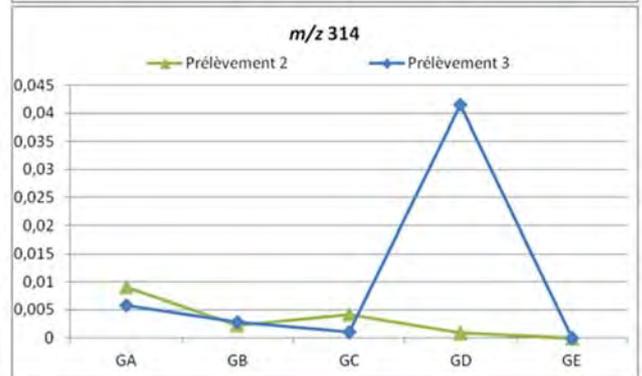
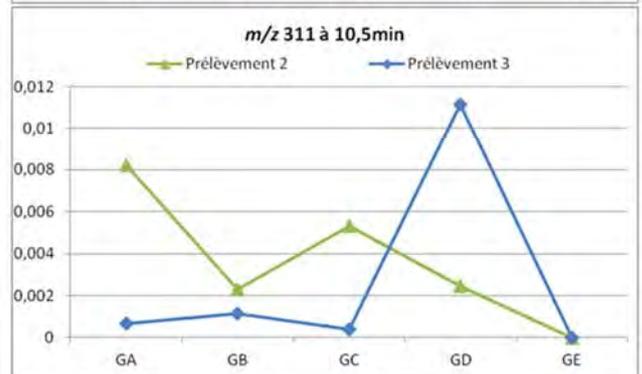
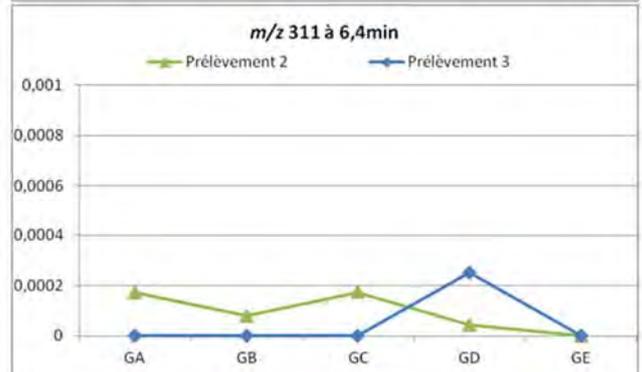
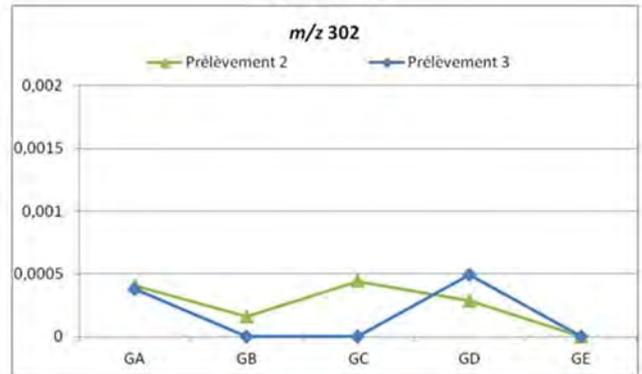
Sérums



Urines



Sérums



Annexe 4. Revue : Human African trypanosomiasis: For a simplified diagnosis

BioMed Research International, en revision le 21.06.2015

New and accurate field-adapted diagnostic methods for Human African trypanosomiasis

Julien BONNET¹, Clotilde BOUDOT¹, Bertrand COURTILOUX¹

¹-INSERM, Univ. Limoges, CHU Limoges, UMR_S 1094, Tropical Neuroepidemiology, Institute of Neuroepidemiology and Tropical Neurology, Limoges, France.

Corresponding author:

Bertrand COURTILOUX

Faculté de Pharmacie de Limoges

UMR INSERM 1094 NET

2, rue du Dr Marcland

87025 Limoges, France

bertrand.courtioux@unilim.fr

Abstract

Sleeping sickness is a parasitic infection caused by two species of trypanosomes (*Trypanosoma brucei gambiense* and *rhodesiense*), transmitted by the tsetse fly. The disease eventually affects the central nervous system, resulting in severe neurological symptoms. Without treatment, death is inevitable. The diagnosis and subsequent management of patients require appropriately trained personnel, sophisticated technical resources, medication and well-equipped health centers. In affected areas, adequately trained health workers are scarce. The task faced by the medical personnel is further complicated by the lack of support from local health infrastructure, which is at best weak, but often non-existent. Therefore, according to estimates, only 10% of those affected by the illness receive adequate treatment. Bearing in mind that during the first stage of the disease, infected patients are mildly symptomatic and early detection of infection allows safer treatment (administered on an outpatient basis) which can avoid death, routine screening of the exposed population is necessary, especially in areas of high endemicity. Addressing the issues of high death rates, induced resistance levels, and the administration of existing treatments requires the support of specialized hospital services and qualified medical personnel. This review summarizes the current diagnostic procedures and presents the various aspects that require further consideration.

1- General presentation of the disease

Human African Trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, is a vector-borne parasitic disease endemic in sub-Saharan Africa. Recently, its prevalence has dropped, largely because of the implementation of controls and intervention programs. It belongs to the group of neglected tropical diseases and affects the poorest populations in the world. It is considered to be a huge threat to public health. Three severe epidemics have ravaged at risk populations. The first occurred at the end of the 19th century, the second during the 1920s, and the most recent began at the end of the 1970s and continues today (1). This disease outbreak is essentially linked to diverse social, economic and political issues. Indeed, 36 sub-Saharan African countries are affected (2, 3), especially poor and remote rural regions (Figure 1). Furthermore, current estimations show that 70 million people live at risk of contracting HAT infection. Among these, 57 million people are at risk of developing *gambiense* HAT and 12.3 million people are at risk of contracting *rhodesiense* HAT (3). This disease is considered by the World Health Organization (WHO) to be one of the neglected tropical diseases, for which it is necessary to establish population screening and disease control measures. In 2013, the World Health Assembly adopted resolution WHA66.12 regarding all 17 neglected tropical diseases, with the target of eliminating HAT as a public health problem by 2020 (4).

This disease is transmitted by the bite of the tsetse fly during its blood meal. The *Glossina* vector belongs to the Diptera order. *Glossina* is viviparous and both the male and female are capable of spreading disease (1). Many subgenus flies are involved in the transmission of parasites: *G. palpalis palpalis* and *G. p. gambiensis* transmit *T. b. gambiense* and *G. morsitans* transmits *T. b. rhodesiense*. These flies need particular conditions to survive (temperature 16°C-38°C, 50%-80% relative humidity) (3). However, the *Glossina* is classed as a “bad vector”,

because it loses parasites at every blood meal, and because the female produces only 10 larvae during its lifetime.

Human African Trypanosomiasis is caused by an extracellular parasite called *Trypanosoma* (genus) *brucei* (species). There exist 3 subspecies, which possess identical morphological characteristics (presence of a flagellum, a kinetoplast, a nucleus) but differ in their ability to infect various hosts. *Trypanosoma brucei brucei* is a domestic animal parasite, which transmits Nagana disease, which is not pathogenic to humans because its lysis requires a haptoglobin-like molecule (1). This parasite has proven particularly useful for research purposes. Regarding the 2 human pathogens (5), *T. b. gambiense* is an anthroponotic parasite found in 24 countries of central and western Africa, and causes a chronic syndrome. *T. b. rhodesiense* is zoonotic, and is endemic in 13 countries of eastern and southern Africa, and causes an acute syndrome (3). However, increasingly the spread of *T. b. rhodesiense* has been found to be extending towards West Africa, especially Uganda, where the 2 disease forms overlap.

During the blood meal, the infected tsetse fly injects its saliva to prevent the coagulation of the host blood, and the metacyclic trypomastigote trypanosomes are injected subdermally into the host (3). The trypanosomes proliferate at the site of inoculation and then transform into bloodstream trypomastigotes form during the first disease stage. That form can then multiply by binary fission, in different body fluids (blood, lymph) and can move to the cerebrospinal fluid (CSF), signaling the beginning of the second disease stage. If a new, non- infected tsetse fly bites the infected host, it can ingest parasites, in their bloodstream trypomastigote form, which can move to the fly midgut, where some will differentiate into procyclic trypomastigotes. Afterwards, the parasites migrate from the midgut to the salivary gland and transform into epimastigotes. In the salivary gland, the epimastigotes further transform into metacyclic trypomastigotes and await a new fly blood meal (Figure 2).

HAT clinically evolves in two stages and the symptoms for the *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense* forms are often the same, but their frequency, severity and kinetic appearance differ. Indeed, *T. b. rhodesiense* can cause patient death within 6 months, whereas *T. b. gambiense* patients can survive for more than 10 years (6, 7).

The first stage is called the hemolymphatic or bloodstream stage, and is characterized by an intermittent fever, headaches, pruritus, lymphadenopathy, asthenia, anemia, and hepatosplenomegaly (1, 3). Once the parasites cross the blood-brain barrier (BBB), the meningoencephalic stage begins and the major symptoms are neuropsychiatric and include sleep disturbances, abnormal movement, limb paralysis, hemiparesis, irritability, aggressive behavior and psychotic reactions (1, 3, 6). This second stage is fatal if untreated.

Moreover, the impact on quality of life is potentially devastating, as affected subjects are unable to work for several years, which engenders poverty and social exclusion. Treatment development and therapeutic management are therefore very important. Treatments are separated into two groups.

The first group of treatments is composed of Pentamidine (Pentacarinat®) and Suramin (Moranyl®), and these treatments are mainly used during early disease stages. Pentamidine is the drug of choice for treatment of the *T. b. gambiense* form, while Suramin is used for *T. b. rhodesiense* treatment. However, Suramin cannot be used against *T. b. gambiense* in western and central Africa, because there is a risk of adverse reaction if combined with the medication used to treat *Onchocerca spp.* (1). Pentamidine is administered intramuscularly and Suramin through intravenous injection. Pentamidine is generally well tolerated, despite side effects including hypoglycemia, nausea and vomiting and injection site pain. Suramin can cause severe reactions, such as allergic reaction, hypersensitivity, nephrotoxicity, hematuria or peripheral neuropathy (8).

Second stage treatments include Melarsoprol (Arsobal®), Eflornithine (DFMO or α -Difluoromethylornithine) and the more recently developed Eflornithine/Nifurtimox combination therapy. Melarsoprol and Eflornithine are administered by intravenous injection; Nifurtimox is given orally. Melarsoprol is the only medication which can be used to treat both HAT forms (1, 8), although one of the known side effects is an increased risk of a potentially fatal encephalopathic syndrome. Eflornithine is the newest treatment and can be used as an alternative to Melarsoprol for *T. b. gambiense* disease therapy. However, Eflornithine causes similar adverse drug reactions as antineoplastic agents (9). Nifurtimox can only be used in association with Eflornithine, against *T. b. gambiense*, and increases the efficacy of Eflornithine.

Aside from the not insignificant adverse effects of these medications, a degree of drug resistance has evolved in the 15 to 50 years that these treatments have been employed. Therefore, the development of new, effective and safe therapies is essential to advance the fight against HAT.

Recently, two new candidate drugs have been proposed. Fexinidazole, the 2-substituted 5-nitroimidazole, belongs to the nitroimidazole class of drugs (10, 11). This pharmacological class includes many active compounds, several of which target trypanosomes. Fexinidazole was discovered in the 1980s by the Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), and was developed jointly with Sanofi. In studies, Fexinidazole exhibited trypanocidal properties, and demonstrated the potential to become a safe, short-course oral treatment for both HAT stages. Furthermore, this therapy, currently undergoing phase 2/3 clinical trials in treatment centers in the Democratic Republic of Congo (DRC) and Central African Republic (CAR), may avoid the necessity of disease stage screening and excessive treatment (10, 12).

The other potential treatment candidate, Benzoxaborole or SCYX-7158, is a by-product of the family of oxaboroles, developed by Anacor Pharmaceuticals. This drug proved highly effective

in preclinical studies, and is in phase 1 clinical trials today, as a single dose oral treatment for both HAT stages (11, 13). This drug would be the ideal candidate to use for disease elimination, if current trials prove successful.

To date, these ideal treatment options are not available in the field and treatment remains “stage dependent” with serious side effects and potential complications during the second stage of the disease. Improvement in staging diagnoses and early screening methods are current challenges which would avoid delayed patient treatment.

2- Management of the disease in the field: diagnosis

Diagnosis should be made as early as possible, in order to avoid disease progression to the neurological stage, which may necessitate complex and potentially unsafe treatments. Exhaustive screenings require major investment in personnel and material resources. In Africa such resources are often limited, especially in remote areas where the disease is most common. As a result, many infected people may die before diagnosis or treatment.

2.1- The diagnosis of HAT is based on active screening in four steps (Figure 3)

Four steps are needed for adequate patient examination and successful diagnosis (1):

- Step one: serological tests such as the card-agglutination trypanosomiasis test (CATT) are useful for initial population screening to identify suspected cases. The CATT/*T. b. gambiense* test, developed in the late 1970s, can be carried out on serum, capillary blood obtained from a finger prick, or blood from impregnated filter papers (14). A rapid antibody detection assay, CATT is currently used in several African countries to facilitate field surveys on gambiense sleeping sickness. It allows hundreds of individuals to be screened daily, and is reported to be 87-98% sensitive and 93-95% specific (15, 16). To date, CATT remains the most efficient screening method used in the field, and is adapted for mass population screening in endemic areas (17, 18).

- Step two: when the CATT yields a positive result, the patient undergoes lymph node palpation. The lymph node fluid is then examined for parasites. However, any delay between sampling and examination introduces a possible risk of trypanosome lysis which can affect sample interpretation. The sensitivity of lymph node palpation and aspiration varies from about 40% to 80% depending on parasite strain, stage of disease, and the prevalence of other diseases which may cause lymphadenopathy.

- Step three: CATT titration is carried out (CATT dilution on successive dilutions) when no trypanosomes are found in the lymph nodes. If the titration yields a result of $> 1/8$ (specificity close to 100%), the parasite must be sought in another biological fluid. If the titration is $< 1/8$ the subject can be considered clear of infection. Some investigators recommend treatment of individuals with high CATT titers ($\geq 1:16$), even if parasitological examination is negative in populations with high disease prevalence ($> 1\%$), especially when the most sensitive blood detection methods (quantitative buffy coat or miniature anion-exchange centrifugation techniques) cannot be used (19).

- Step four: parasitological investigation with minicolumns by anion exchange (mini Anion Exchange Centrifugation Technique or mAECT) can be carried out on venous blood if the CATT is $> 1/8$ after capillary tube centrifugation (CTC).

Disease stage identification, by examination of the cerebrospinal fluid (CSF), obtained by lumbar puncture, helps to establish the degree of progression of the disease, and subsequently to determine the most appropriate treatment in each case.

Figure 3

2.2 Stage diagnosis

Differentiation between the two stages can only be done by examination of the CSF after lumbar puncture. It is also possible to concentrate the CSF, in order to increase the sensitivity, by capillary tube centrifugation (CTC) (20).

The detection of trypanosomes in CSF by microscopy alone has limited sensitivity, even after concentration by centrifugation (20) and has a poor reproducibility rate. The number of parasites circulating in CSF can be very low, generating false negative results. An increased white blood cell (WBC) count in CSF is an indicator of meningitis and can help to increase the sensitivity of parasite detection.

The WHO diagnostic criteria, which require the presence of trypanosomes in the CSF or a WBC count of more than 5 cells per μL , or both (1) are the most widely used guidelines for diagnosing late stages of the disease. Some clinicians use a higher white blood cell count cutoff

point such as 20 cells per μL , especially for diagnosing CNS *T. b. gambiense* HAT. A consensus about the optimum WBC count of 10 cells per μL has been suggested for staging HAT (21).

There are reports of some patients with CSF white blood cell counts of 20 cells per μL or less being treated successfully with an early-stage drug like pentamidine, which highlights the possibility of an intermediate stage of infection (22, 23, 24). This intermediate stage is characterized by parasites which have crossed the BBB but have not yet spread to the brain parenchyma.

Another potential parameter which may assist with late-stage diagnosis is the measurement of CSF IgM concentrations, which, due to synthesis within the spinal cord, are increased early in disease development in cases where there is CNS involvement. However all of these approaches have an intrinsic drawback; there is no gold standard of CNS HAT diagnosis with which to compare any new methods (21). Furthermore, WBC counting is not specific to sleeping sickness, and alternative diagnoses or coexisting diseases, such as malaria, syphilis, HIV infection, tuberculosis and toxoplasmosis need to be investigated and excluded. Most of the articles which report on the staging of sleeping sickness disease agree that WBC counting must be supported and confirmed by newer, more advanced diagnostic procedures.

3- New research pathways to improve the diagnosis of HAT

3.1- Screening of the population

Existing diagnostic procedures are complex and cumbersome to implement because they require specialized mobile teams, trained to carry out rapid testing using invasive protocols. Research on this disease seeks to develop simplified tests which enable the integration of

activities related to HAT diagnosis within the public health infrastructure. Thus, the target of HAT phase-out by 2020, as stipulated in the WHO roadmap and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases will have to be achieved through the development of rapid tests which are easy to produce on a large scale (25). Several promising tests are under development. Lateral flow immunochromatographic devices can detect low concentrations of antibodies targeting antigens in biological fluids (26, 27). This technology can be used to develop rapid diagnostic tests (RDTs) that detect anti-trypanosome antibodies in human finger prick blood samples. These RDT-based lateral flow devices are simple to use, easy to read and have stability characteristics that allow wide distribution and availability in remote endemic areas. The first RDTs for HAT diagnosis have currently being tested in the field. The tests were developed by Standard Diagnostics (SD BIOLINE HAT) and Coris Bioconcept (Sero-K-SeT) (28, 29). They are based on a device using native surface glycoproteins (VSG) LiTat 1.3 and LiTat 1.5 to test for anti-trypanosome antibodies (28, 29). Both tests show good ranges of sensitivity and specificity when compared to CATT (29), however, improvements are still needed especially to facilitate test production and cost. Thus, recombinant antigens are currently being produced in line with these objectives.

The second prototype device, which uses the potential ISG65 diagnosis (30), is based on a combination of recombinant and native ISG65 VSG MiTat1.4 (31). ISG 65 is one of two well-characterized type 1 invariant surface glycoproteins, which have moderately abundant transmembrane domains, expressed in *T. brucei* (32).

3.2- Advances in CSF stage diagnosis

Current treatments for the late disease stage, such as Melarsoprol have an overall mortality rate of 5%, and so there is an urgent need to develop a quick, reliable, easy to perform and cheap diagnostic test that can be used for HAT staging. The research and development of methods for disease staging have been revitalized, especially through an initiative launched by FIND and WHO in the 2000s and several alternative staging biomarkers and tools are under investigation.

3.2.1-Antibodies

Many published studies have investigated disease diagnosis, at the molecular level. In blood, and particularly plasma samples, some studies have observed decreased levels of cytokines such as IFN- γ or IL-10 and NO post-treatment. These markers may be compared to control subject plasma (33). Staging studies have primarily focused on CSF as the ideal body fluid for examination, due to its proximity to the CNS. Some research has focused on CSF antibodies. An alteration in the protein concentration of CSF, such as an increase in albumin or immunoglobulin, could indicate a BBB dysfunction or increased intrathecal synthesis of proteins (34). We have known since the 1980s that the increased concentration of immunoglobulin in the CSF and the absence of a switch between IgM and IgG are characteristic of the immune response in the brain. More recently, some publications have demonstrated that the increased intrathecal IgM fraction is a sign of the presence of a brain inflammatory process, not necessarily connected to damage of the BBB in Stage 2 HAT patients (35). Intrathecal IgM levels are considered by many to be superior to WBC counting as a parameter for HAT staging, especially for *T. b. gambiense* cases.

3.2.2- Cytokines and chemokines

Another field of research being explored for the development of new diagnostic procedures for HAT staging is the modulation of immune-effectors such as cytokines and chemokines. The neuro-inflammation seen in late stage HAT presents some characteristics such as the early activation of macrophages and astrocytes, the up-regulation of inflammatory cytokines and the presence of Mott cells (plasma cells containing IgM). Activated astrocytes and macrophages are two important sources of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the brain. The level of these cytokines and chemokines has been measured for the investigation of their diagnostic potential both in *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense*. Cytokines and chemokines are also associated with the recruitment of leukocytes to the site of inflammation and their passage through the BBB, but also with the increase of WBC observed in CSF during the second stage of HAT. The most interesting cytokines and chemokines used for staging sleeping sickness are IL-10, IL-6, IL-1 β , CCL-3, CXCL-8, SLPI, Lipocalin 2, ICAM-1, VCAM, MMP-9, MMP-2, CXCL-10 and CXCL-13 (35, 36), which permit the activation and amplification of the immune response and allow leukocytes who are sequestered in the perivascular space to transmigrate across the basement membrane and the glial limitans to reach the brain parenchyma (37). A recent study initially evaluated the most promising molecules such as CXCL-10, CXCL-13, ICAM-1, VCAM-1, IgM, MMP-9, B2MG and confirmed their capacity to act as accurate staging markers (38). Furthermore, Neopterin as a new marker for staging of HAT was introduced and validated (38, 39). Neopterin is an indicator of activation of the cellular immune response, and was used as a marker in cases where patients were subsequently cured within 6 months of treatment. The possibility of establishing a quick blood test for additional lateral disease testing, which is appropriate for field application is advancing and is currently the primary focus of research and development (40). This study was conducted only on *T. b. gambiense* patients. Some studies describe different outcomes for *T. b. rhodesiense* patients, largely due the different neuropathogenesis of the two diseases (41). In addition to being good

staging markers, the level of these molecules seems to correlate with the severity of the neurological symptoms and therefore may assist with screening for the advanced second HAT stage (21). The downside of these markers is the lack of specificity. Indeed, 80% of the CSF proteome is composed of blood derived proteins (42), and only the remaining 20% are produced in the brain, and so they are rarely considered to be specific to the neuro-immune response (34). Moreover, these molecules are not specific markers of sleeping sickness, and other diseases such as malaria, which is also largely present in the countries affected by HAT, may also be responsible for the increased levels of these cytokines and chemokines. The vast majority of studies regarding this topic advocate the combination of multiple markers to increase staging accuracy (43, 44).

3.2.3- Proteomics

Another approach currently under investigation is the evaluation of the changes in protein expression between pathological and healthy conditions. Only a few studies have established first and second stage HAT disease CSF protein profiles. Previous studies have shown a large increase in the amount of immunoglobulins for stage 2 patients, but they also show 73 proteins which are differentially expressed between the two stages. Two of these proteins, osteopontin and beta-2-microglobulin, were confirmed to be accurate markers of first and second stage patients (45).

3.2.4- Polysomnography

In recent years, research has been conducted on the most typical clinical manifestation of HAT: the alteration of the normal sleep-wake cycle (1). Polysomnography has been used for these

studies. Polysomnography is a medical examination which involves the recording of several physiological variables such as respiratory and heart rate, and carrying out other tests including an electroencephalogram, an electromyogram and an electrooculogram, during patient sleep, in order to investigate sleep disorders. Studies show a high number of Sleep Onset Rapid Eye Movement Periods (SOREMP) in stage 2 patients during their sleep, not only restricted to nighttime, but also during daytime sleep too. Treatment with Melarsoprol seems to reduce the appearance of SOREMPs. In spite of the successful outcomes of these studies and the non-invasive nature of this diagnostic tool, polysomnography is largely neglected due to the difficulty in establishing the necessary environment for such examinations, which require high-tech and bulky material, trained personnel and extended examination periods (23). It is therefore difficult to use as a diagnostic tool in the field. Moreover, this diagnostic tool is not specific because the observed increase in SOREMPs may be attributed to other sleep disorders. In addition, SOREMPs may be detected early in the disease, and so are not specific markers of stage 2 HAT.

3.2.5- DNA amplification

Carrying out PCR to amplify specific parasite DNA sequences obtained from blood, CSF, urine or saliva samples has been proposed for staging of the disease. The Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for staging HAT disease is promising and shows high specificity and sensitivity. Furthermore, for this technique, the target DNA is amplified at a constant temperature, so this test can be used in the field with minimal equipment or in the low level laboratories available in HAT endemic countries. The test can be performed on fresh blood samples, or even on blood samples which are dried on microscopy slides or on ordinary filter papers. Moreover, no gel electrophoresis is required, as positive results can be visually

identified (fluorescence, white precipitate or color change) and the analysis of several samples may be carried out simultaneously. Sets of specific primers were designed and validated and the reproducibility was verified using samples obtained from HAT patients (46, 47, 48). This test is currently used mainly in DRC and Angola for disease staging and is employed up to 24 months after treatment is completed, in order to confirm disease remission [http://www.finddiagnostics.org/programs/hat-ond/hat/molecular_diagnosis.html]. A similar technique for RNA amplification has recently been introduced. The *Trypanozoon*-specific real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) assay allows the detection of parasite 18S ribosomal RNA (49).

A recent study using CSF PCR of *T. b. gambiense* patients for stage determination indicated a good staging accuracy of PCR especially for stage 2 patients before treatment. However, for the post-treatment follow up this same study indicated poor sensibility and specificity of PCR on blood and CSF, with frequent false positive obtained for cured patient samples (50). The specificity and sensitivity of a diagnostic PCR mainly depends on the DNA sequence targeted by the primers. Therefore it is important to continue research for optimizing amplification, by designing new primers (50).

4- The end of the disease

The successful eradication of the disease in Africa needs better diagnosis and treatment for all patients. Another point to consider is the vector population. The fight against the vector tsetse fly has an essential role in the control of the disease in all parts of Africa. Local people should be educated about disease control and trained in the installation and maintenance of fly traps. Vector control policies are intended to maintain a very low level of transmission. Unfortunately,

the most endemic areas of sleeping sickness in Africa are also the least geographically accessible.

Another aspect of the fight against this disease is the role of local and international policies. After more than 50 years of neglect, the international community has recognized the need to eliminate sleeping sickness in Africa. The signing of a partnership agreement in 2001 between the WHO and Aventis, announced the advent of a new era in the fight to eliminate the *Trypanosoma* parasite from the African continent. Private partners, Non-Government Organizations (NGOs), institutional partners and the Belgian and French governments are fully engaged, working hand in hand with relevant organizations (WHO, FAO ...). It is also important to note that the Organization of African Unity, at its meeting of heads of state in Lomé (Togo) in June 2000, established the Pan-African campaign to eradicate the tsetse fly and trypanosomiasis (PARC Tsetse and Trypanosomiasis, PATTEC). However the current geopolitical problems in African countries do not facilitate these projects.

Figure 1: Number of new cases of HAT reported in 2013 to the WHO (1).

Figure 2: Life cycle of HAT.

Figure 3: Decision tree of HAT stage diagnosis.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

- 1- R. Brun, J. Blum, F. Chappuis, and C. Burri, "Human African trypanosomiasis," *Seminar, The Lancet*, vol.375, pp. 148-59, 2010.
- 2- P. Simarro, A. Diarra, J.A. R. Postigo, J.R. Franco, and J.G. Jannin, "The Human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: The way forward," *PLoS, Neglected Tropical Diseases*, vol.5, e1007, 2011.
- 3- J.R. Franco, P.P. Simarro, A. Diarra, and J.G. Jannin, "Epidemiology of Human African trypanosomiasis," *Clinical Epidemiology*, vol.6, pp. 257-275, 2014.
- 4- H.E. Mableson, A. Okello, K. Picozzi, S.C. Welburn, "Neglected zoonotic diseases-the long and winding road to advocacy," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.8, e2800, 2014.
- 5- J.M. Sternberg, and L. Maclean, "A spectrum of disease in Human African trypanosomiasis: the host and parasite genetics of virulence," *Parasitology*, vol.137, pp. 2007-2015, 2010.
- 6- J. Pepin, and H.A. Meda, "The epidemiology and control of Human African trypanosomiasis," *Advances in Parasitology*, vol.49, pp. 71-132, 2001.

7- F. Checchi, J.A.N. Filipe, D.T. Haydon, D. Chandramohan and F. Chappuis, "Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness," *BMC (BioMed Central) Infectious Diseases*, vol.8, pp. 1-10, 2008.

8- C. Burri, "Chemotherapy against Human African trypanosomiasis: Is there a road to success?," *Parasitology*, vol.137, pp. 1987-1994, 2010.

9- G. Priotto, L. Pinoges, I. Badi Fursa, B. Burke, N. Nicolay, G. Grillet, C. Hewison, and H. Balasegaram, "Safety and effectiveness of first line eflornithine for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Sudan: cohort study," *BMJ (British Medical Journal) Research*, vol.336, pp. 705-708, 2008.

10- E. Torreale, B. Bourdin Trunz, D. Tweats, M. Kaiser, R. Brun, G. Mazué, M.A. Bray, and B. Pécou, "Fexinidazole: A new oral Nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.4, e923, 2010.

11- G. Eperon, M. Balasegaram, J. Potet, C. Mowbray, O. Valverde, and F. Chappuis, "Treatment options for second stage *gambiense* Human African trypanosomiasis," *Expert Review of Anti-infective Therapy*, vol.12, pp. 1407-1471, 2014.

12- A. Tarral, S. Blesson, O. Valverde Mordt, E. Torreele, D. Sassella, M.A. Bray, L. Hovsepian, E. Evene, V. Gualano, M. Felices, and N. Strub-Wourgaft, "Determination of an optimal dosing regimen for Fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of Human African trypanosomiasis: First-in-Human studies," *Clinical Pharmacokinetics*, vol.53, pp. 565-580, 2014.

13- R.T. Jacobs, B. Nare, S.A. Wring, M.D. Orr, D. Chen, J.M. Sligar, M.X. Jenks, R.A. Noe, T. S. Bowling, L.T. Mercer, C. Rewerts, E. Gaukel, J. Owens, R. Parham, R. Randolph, B. Beaudet, C.J. Bacchi, N. Yarlett, J.J. Plattner, Y. Freund, C. Ding, T. Akama, Y.K. Zhang, R. Brun, M. Kaiser, I. Scandale, and R. Don, "SCYX-7158, an orally-active Benzoxaborole for the treatment of stage 2 Human African trypanosomiasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.5, e1151, 2011.

14- E. Magnus, T. Vervoort, N. Van Meirvenne, "A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis," *Annales de la Société belge de médecine tropicale*, vol.58, pp. 169-176, 1978.

15- L. Penchenier, P. Grebaut, F. Njokou, V. Eboo Eyenga, and P. Büscher, "Evaluation of LATEX/ *T.b.gambiense* for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in central Africa," *Acta Tropica*, vol.85, pp. 31-37, 2003.

16- V. Jamonneau, P. Truc, A. Garcia, E. Magnus, and P. Büscher, "Preliminary 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*, vol.76, pp. 175-183, 2000.

17- P. Lutumba, J. Robays, C. Miaka, V. Kande, P.P. Simarro, A.P. Shaw, B. Dujardin, and M. Boelaert, "The efficiency of different detection strategies of Human African trypanosomiasis by *T.b.gambiense*," *Tropical Medicine and International Health*, vol.10, pp. 347-356, 2005.

18- J. Robays, M.M. Bilengue, P.V. Stuyft, and M. Boelaert, "The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo," *Tropical Medicine and International Health*, vol.9, pp. 542-550, 2004.

19- F. Chappuis, E. Stivalello, K. Adams, S. Kidane, A. Pittet, P.A. Bovier, "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," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 71, pp. 313-317, 2004.

- 20- P. Lutumba, J. Robays, C. Miaka, V. Kande, D. Mumba, P. Büscher, B. Dujardin, and M. Boelaert, "Validité, coût et faisabilité de le mAECT et CTC comme test de confirmation dans la detection de la Trypanosomiase Humaine Africaine," *Tropical Medicine and International Health*, vol.2, no. 4, pp. 470-478, 2006.
- 21- P.G.E. Kennedy, "Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges," *The Journal of Clinical Investigation*, vol.113, pp. 496-504, 2004.
- 22- S. Bisser, V. Lejon, P.M. Preux, B. Bouteille, A. Stangellini, M.O. Jauberteau, P. Büscher and M. Dumas, "Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulins compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness," *Journal of Neurological Sciences*, vol. 193, pp. 127-135, 2002.
- 23- A. Buguet, S. Bisser, T. Josenando, F. Chapotot, and R. Cespuglio, "Sleep Structure: a new diagnostic tool for stage determination in sleeping sickness," *Acta Tropica*, vol.93, pp. 107-117, 2005.
- 24- A. Buguet, R. Cespuglio and B. Bouteille "Chapitre 33 : Trypanosomose humaine Africaine," *Les troubles du sommeil*, vol. 2, pp. 399-406, 2012
- 25- WHO Expert Committee, "Control and surveillance of human African trypanosomiasis." *WHO Technical Report Series 984*, WHO Press, pp. 250, 2013.

- 26- G.A. Posthuma-Trumpie, J. Korf, and A. van Amerongen, "Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol.393, pp. 569-582, 2009.
- 27- B. O'Farrell, "Lateral flow immunoassay systems: Evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays." In: Wild D, editor. *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA, and related techniques*. Oxford: Elsevier, pp.89-107, 2013.
- 28- P. Büscher, Q. Gillemann, V. Lejon, "Rapid diagnostic test for sleeping sickness." *New England Journal Medicine*, vol.368, pp. 1069-1070, 2013.
- 29- FIND Diagnostics, "The first rapid test to screen for sleeping sickness is launched." FIND Diagnostics. 2012.
- 30- L. Sullivan, S.J. Wall, M. Carrington, M.A. Ferguson, "Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for human African trypanosomiasis and generation of a prototype lateral flow immunodiagnostic device." *PLoS Neglected Tropical Disease*, vol.7, e2087, 2013.
- 31- L. Sullivan, J. Fleming, L. Sastry, A. Mehlert, S.J. Wall, M.A. Ferguson, "Identification of sVSG117 as an Immunodiagnostic Antigen and Evaluation of a Dual-Antigen Lateral Flow Test for the Diagnosis of Human African Trypanosomiasis." *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.8, e2976, 2014.

32- K. Ziegelbauer, G. Multhaupt, P. Overath, "Molecular Characterization of 2 Invariant Surface Glycoproteins Specific for the Blood-Stream Stage of *Trypanosoma brucei*." *Journal of Biological Chemistry*, vol.267, pp. 10797-10803, 1992.

33- B. Courtioux, C. Boda, G. Vatunga, L. Pervieux, T. Josenando, P. Mengue M'Eyi, B. Bouteille, M.O. Jauberteau-Marchand, and S. Bisser, "A link between chemokine levels and disease severity in Human African trypanosomiasis," *International Journal for Parasitology*, vol.36, pp. 1057-1065, 2006.

34- H. Reiber, and J. Peter, "Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evolution programs," *Journal of the Neurological Sciences*, vol.184, pp. 101-122, 2001.

35- N. Tiberti, A. Hainard, and J. Sanchez, "Translation of Human African trypanosomiasis biomarkers towards field application," *Transnational Proteomics*, vol.1, pp. 12-24, 2013.

36- B. Courtioux, L. Pervieux, G. Vatunga, B. Marin, T. Josenando, M.O Jauberteau-Marchand, B. Bouteille, and S. Bisser, "Increased CXCL-13 levels in Human African trypanosomiasis meningoencephalitis," *Tropical Medicine and International Health*, vol.14, pp. 529-534, 2009.

37- K. Kristensson, M. Nygard, G. Bertini, and M. Bentivoglio, "African trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry and effects on sleep and synaptic functions," *Progress in Neurobiology*, vol.91, pp. 152-171, 2010.

38- N. Tiberti, A. Hainard, V. Lejon, B. Courtioux, E. Matovu, J.C. Enyaru, X. Robin, N. Turck, K. Kristensson, D. Mumba Ngoyi, G. Vatunga, S. Krishna, P. Büsher, S. Bisser, J. Mathu Ndung'u, and J.C. Sanchez, "Cerebrospinal fluid neopterin as marker of the meningoencephalitic stage of *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness," *PlosOne*, vol.7, e40909, 2012.

39- N. Tiberti, E. Matovu, A. Hainard, J. Enyaru, V. Lejon, X. Robin, N. Turck, D. Mumba Ngoyi, S. Krishna, S. Bisser, B. Courtioux, P. Büscher, K. Kristensson, J. Mathu Ndung'u, and J.C. Sanchez, "New biomarkers for stage determination in *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness patients," *Clinical and Translational Medicine*, vol.2, pp. 1-8, 2013.

40- S. Bühner-Sekula, F.F.V. Hamerlinck, T.A. Out, L.G. Brodewijk, and P.R. Klaster, "Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera," *Journal of Immunological Methods*, vol.238, pp. 55-58, 2000.

41- L. MacLean, M. Odiit, and J.M. Sternberg, "Intrathecal cytokine response in *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness patients," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.100, pp. 270-275, 2006.

42- X. Yuan, and D.M. Desiderio, "Proteomics analysis of Human cerebrospinal fluid," *Journal of Chromatography B*, vol.815, pp. 179-189, 2005.

43- A. Hainard, N. Tiberti, X. Robin, V. Lejon, D. Mumba Ngoyi, E. Matovu, J.C. Enyaru, C. Fouda, J. Mathu Ndung'u, F. Lisacek, M. Müller, N. Turck, and J.C. Sanchez, "A combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP panel for the staging of Human African trypanosomiasis patients," *PlosOne*, vol.3, no. 6, e459, 2009.

44- L. MacLean, H. Reiber, P.G.E Kennedy, and J.M. Sternberg, "Stage Progression and Neurological Symptoms in *Trypanosoma brucei rhodesiense* Sleeping Sickness: Role of the CNS Inflammatory Response," *PlosOne*, vol.6, e1857, 2012.

45- N. Tiberti, A. Hainard, V. Lejon, X. Robin, D. Mumba Ngoyi, N. Turck, E. Matovu, J. Enyaru, J. Mathu Ndung'u, A. Scherl, L. Dayon, and J.C. Sanchez, "Discovery and verification of Osteopontin and beta-2-microglobulin as promising markers for staging Human African trypanosomiasis," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol.9, pp. 2783-2795, 2010.

46- Z.K. Njiru, A.S.J. Mikosza, T. Armstrong, J.C. Enyaru, J. Mathu Ndung'u, and A.R.C. Thompson, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*," *PlosOne*, vol.2, e147, 2008.

47- Z.K. Njiru, A.S.J. Mikosza, E. Matovu, J.C.K. Enyaru, J.O. Ouma, S.N. Kibona, A.R.C. Thompson, and J.M. Ndung'u, "African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA," *International Journal for Parasitology*, vol.38, pp. 589-599, 2007.

48- E. Matovu, A.J. Kazibwe, C.M. Mugasa, J. Mathu Ndung'u, and Z.K. Njiru, "Towards point-of-care diagnosis and staging tools for Human African trypanosomiasis," *Journal of Tropical Medicine*, vol.2012, pp. 1-10, 2012.

49- C.M. Mugasa, G.J. Schoone, R.A. Ekangu, G.W. Lubega, P.A. Kager and H.D.F.H. Schallig, "Detection of *Trypanosoma brucei* parasites in blood samples using real-time nucleic acid sequence-based amplification," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 61, pp. 440-445, 2008.

50- S. Deborggraeve and P. Büscher, "Molecular diagnostics for sleeping sickness: what is the benefit for the patient?," *The Lancet*, vol. 10, pp. 433-439, 2010.

Figure 1: Number of new cases of HAT reported in 2003 to the WHO (1).

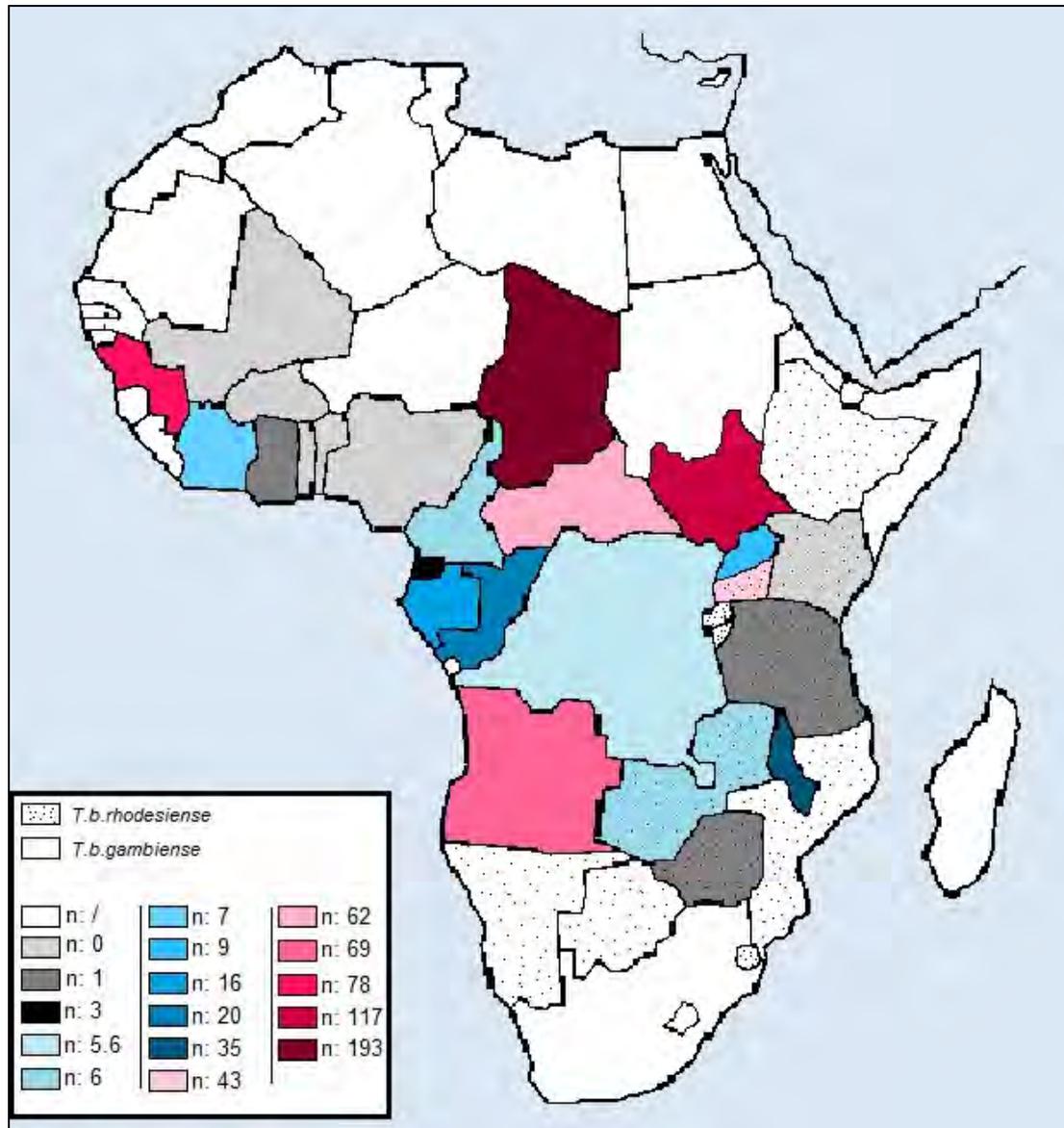


Figure 2: Life cycle of HAT.

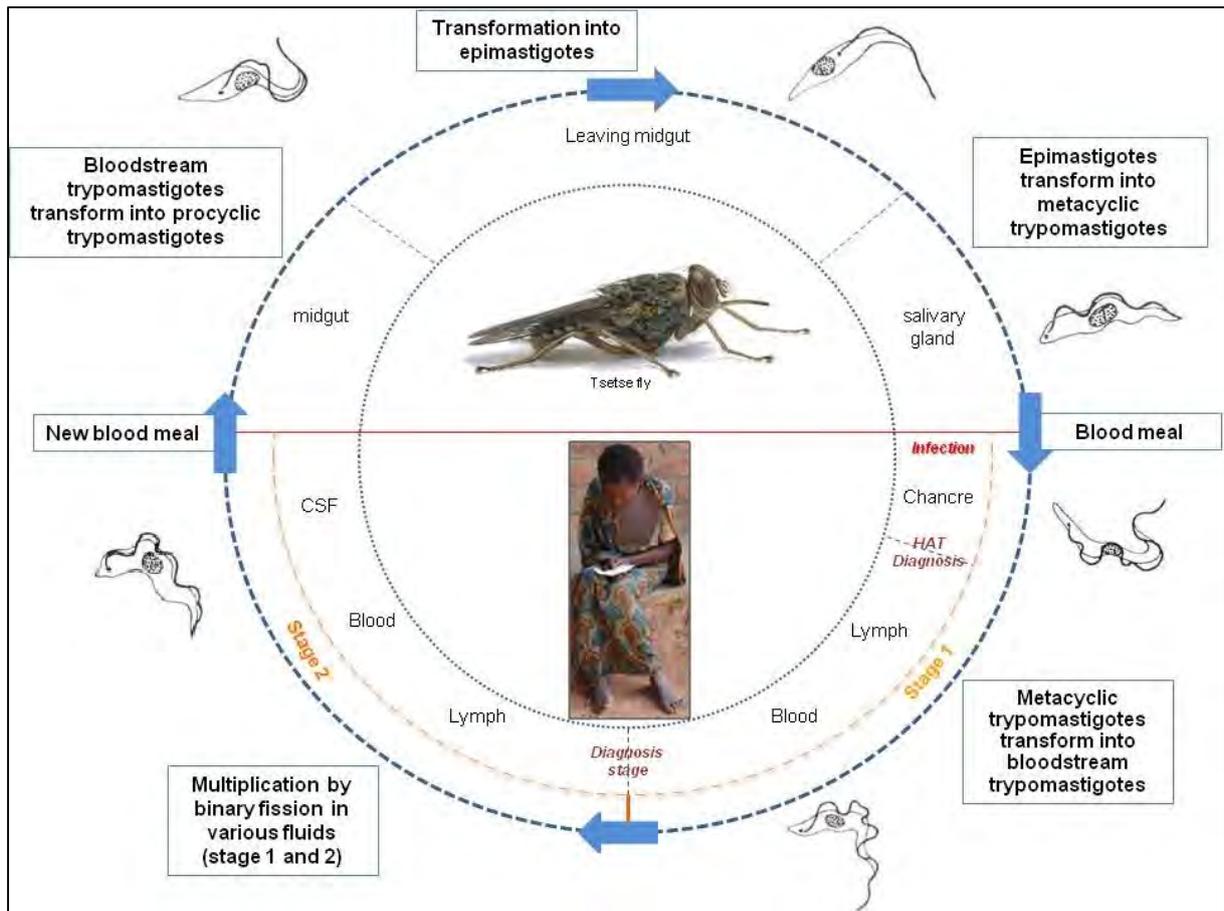
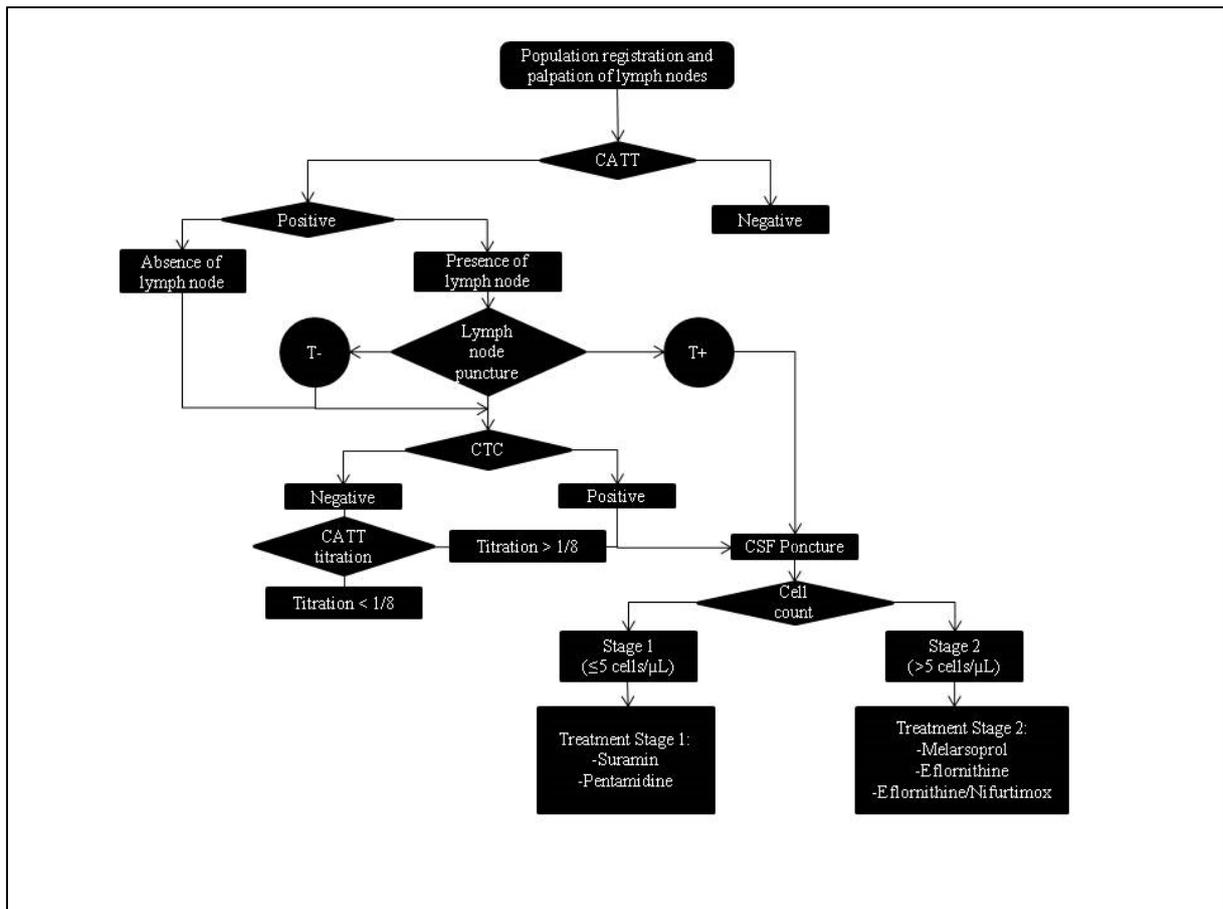


Figure 3: Decision tree of HAT stage diagnosis.



Annexe 5. Article: Characterization of the metabolites of the anti-trypanosomal megazol in mice and human liver microsomes using tandem mass spectrometry. Short running title: Megazol's metabolites characterization in mouse fluids

Characterization of the metabolites of the anti-trypanosomal megazol in mice and human liver microsomes using tandem mass spectrometry

Short running title: Megazol's metabolites characterization in mouse fluids

E. Mespoulet¹, C. Boudot¹, B. Enanga², M. Kaouadji³, E. Pinault⁴, B. Morvan⁵,

S. Bisser¹, N. Picard^{2,6}, B. Courtioux¹.

¹ INSERM UMR 1094, Tropical Neuroepidemiology, Limoges, France, Univ Limoges, School of Pharmacy, Institute of Neuroepidemiology and Tropical Neurology, CNRS FR 3503 GEIST, Limoges, France.

² CHU Limoges, Department of research and innovation, Limoges, France.

³ EA 4021 Biomolécules et Thérapies Antitumorales, School of Pharmacy, Limoges, France.

⁴ Service Commun de Recherche et d'Analyse des Biomolécules de Limoges (SCRABL), plateau de spectrométrie de masse, FR3503 GEIST, Limoges, France.

⁵ BIOS Chemicals, Technologic platform DELTA SUD, Verniolle, France

⁶ INSERM, UMR-S850, Univ Limoges, CHU Limoges, Department of Pharmacology and Toxicology, Limoges.

Corresponding author: bertrand.courtioux@unilim.fr

Keywords: megazol, metabolites, urine, plasma, hepatic microsomes, HPLC-MS/MS, mice fluids

Abstract

Objectives: Human African Trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is confined to remote African areas and transmitted by bite of the tsetse fly (*Glossina sp.*). This neglected tropical disease remains difficult to control due to the complexity of treatment schedules and use of toxic drugs. New effective, easy to use drugs are urgently needed. Megazol, has proven to be an effective anti-trypanosomal drug since over half a century, but its mutagenicity did not allow further development. We therefore decided to characterize megazol metabolites with the hypothesis that they could be less toxic.

Methods: We infected groups of mice with *T. b. brucei* then metabolites were detected by high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry in urine and plasma samples from treated mice, and also following incubation of megazol with human liver microsomes (HLM).

Results: In urine, thirteen metabolites were detected (molar mass $M = 212$; 238, 242x3, 315, 342x2, 357, 402x2, 418x2). In plasma, six metabolites were detected ($M = 212$, 238, and the 343x2, 403 and 418). In HLM incubation, only $M = 212$ and 242 metabolites were found. Using chromatograms and mass spectra data combined with usual metabolism patterns, the structures of all these metabolites were deduced.

Conclusion: Formal structure characterization of these metabolites must be pursued with the determination of their anti-trypanosomal activity and mutagenicity.

1. Introduction

Sixty million people are exposed to human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness throughout sub-Saharan Africa. The disease is transmitted by the bite of a tsetse fly and two different parasite subspecies. Both disease forms are fatal if left untreated: (i) Gambian sleeping sickness corresponds to an infection by *Trypanosoma brucei (T. b.) gambiense*, characterized by a chronic disease with average infection lasting around 3 years, and (ii) Rhodesian sleeping sickness corresponds to an infection by *T. b. rhodesiense*, characterized by an acute disease where death can occur within weeks of infection. The infection progresses from the haemolymphatic stage where parasites spread to the lymphatics, blood, and peripheral organs, to the late encephalitic stage where parasites invade the central nervous system (CNS) to cause a serious meningo-encephalitis that can evolve to death.

Currently, chemotherapy for HAT relies on five drugs including 2 drugs (Suramin, Pentamidine) active in the early disease stage and 3 drugs (Melarsoprol, Eflornithine and Nifurtimox–Eflornithine combination) active during CNS invasion. These drugs are currently available for the patients by donation from SANOFI but there are still many drawbacks to their use. The main drawbacks are: (1) high toxicity for the hosts, which is mainly due to their poor selectivity to the parasite cells compared to the mammalian cells; (2) way of administration, intramuscular or intravenous injections only; (3) very narrow anti-trypanosomal spectrum; and (4) high cost of hospitalization. Overall, although active, these drugs are not ideal to be used in rural settings, drug resistances are spreading and there is a need for an oral form of a drug that could be used in the 2 disease stages. Clearly, improved chemotherapeutics with better selectivity to the trypanosomes are needed to effectively control this disease.

Nitro-heterocyclic compounds are known for their anti-trypanosomal activity since 3 decades. They have been poorly developed because of the mutagenic and carcinogenic potential of their nitroimidazol ring. Among these nitroimidazole derivatives, megalzol is a promising compound that

diffuse easily to the CNS and can be used orally (Boda et al. 2004). However, its development was discontinued due precisely to reports of *in vitro* mutagenicity (Ferreira et al. 1986) (Ferreira et al., 1986) and genotoxicity (Poli et al. 2002) (Nesslany et al. 2004). Other members of this chemical family, for example metronidazole (Freeman et al. 1997) (Sardi et al. 2011) are widely used as antibiotics, indicating that it is possible to select compounds with an acceptable activity /toxicity profile in this class. Even more, fexinidazole which is structurally close to megazol, entered clinical trials for the treatment of HAT with a sufficiently safe profile (Torreele et al. 2010) (Brun et al. 2011). *In vivo* fexinidazole activity is due likely to its two major metabolites, oxide and sulfone (Kaiser et al. 2011). It isn't known if megazol trypanocidal and mutagenic effects are due to parent drug and/or its metabolites. De Morais et al. (1998) tested plasma and urine metabolites of megazol on 3 Salmonella strains. Two were mutagenic in plasma and three in urine, suggesting that megazol metabolites present in the systemic circulation and in urine might differ and be associated with different effects. Lately, Enanga et al. (Enanga et al. 2000) found 4 different metabolites of megazol in primate's urine but further identification could not be performed. We took advantage of a study about megazol minimum effective dose research in mice to store urine and plasma samples. The present study aimed to characterize megazol metabolites in these biological fluids. We describe in this report, isolation and purification assays using reverse-phase liquid chromatography combined by mass spectrometry for chemical structures of megazol derivatives determination.

2. Material and methods

2.1. Experimental infection

Twenty female mice (weighing 25g) were clinically healthy 1 month prior to experimentation.

- (i) The first group (n = 9) was infected with 10^3 trypanosomes (subcutaneous inoculation of 100 μ L containing *T. b. brucei* AnTaT 1.1E (ITMAS 190702) and served to determine the efficacy of megazol in experimental trypanosomosis after a first dose of suramin used to improve

megazol efficiency. The trypanosome strain was purchased in stabilates from the Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

- (ii) The second group (n = 6) was infected and used as infected controls without treatment.
- (iii) The third group (n = 5) was used as controls without infection and treated with suramin to obtain a blank for the pharmacokinetic studies.

All animals were kept under the same conditions according to laboratory animal care guidelines (European convention SPE123).

All the procedures were approved by the Ethical Committee of Limousin.

2.2. Therapeutic protocol

We used a pre-injection of suramin one day before megazol administration for an optimized therapeutic action (Enanga et al. 1998) (Enanga et al. 1999). We infected mice on D0. On D21, mice were treated with suramin (Sigma-Aldrich, St Louis; USA) diluted in physiological water at 20 mg/kg and injected IP in 200 μ L. They were treated with megazol administrations (D22, 23 and 24). All treatments were given at the same time after infection. Megazol (CAS: 19622-55-0) powder was synthesised as previously described (Chauvière et al. 1998, 2003) and obtained graciously from Dr. Morvan (Bios chemicals, Verniolle, France). Megazol, precisely weighed for each animal, was suspended in an aqueous solution of 2% low viscosity carboxymethylcellulose (Merck, Germany) at a dose of 60 mg/kg body weight, i.e. 15 or 30 mL. This suspension was administered *per os* in a final volume of 50 μ L to infected or uninfected mice.

2.3. Sample collection

Blood samples (0.5 mL) were collected by orbital puncture prior to treatment and 3h after megazol first and last administration to animals. Blood was immediately centrifuged at 1630 \times g for 10 min at

5°C to obtain the plasma samples. Urine was collected by the use of a metabolism cage (Tecniplast® Italy) prior to treatment, 3h after megazol first (for 12h) and last (for 24h) administration to animals.

2.4. Sample extraction for megazol metabolites

We optimized an extraction method used previously by Enanga *et al.*(1997), replacing dichloromethane solvent by butan-2-ol in order to obtain a better metabolites extraction. Hundred µL of urine or plasma are vortexed with 20 µL of NaOH(1N, AVS Titrinorm®; Fontenay-sous-Bois, France) then left to stand 5 min. Five mL of butan-2-ol (Prolabo Rhone Poulenc, Paris, France) are added to it, and the whole is kept under rotary stirring (25 rpm, 65°; Rotator SB3, Stuart®, Stone, Staffordshire, United Kingdom) for 20 min and then centrifuged for 10 min at 3500 rpm. The homogeneous liquid is further collected (alkaline extract) and the precipitate under goes an acid extraction by the addition of 65 µL of HCl (1N AVS TITRINORM®, Fontenay-sous-Bois, France) followed by vortex mixing. Samples are then left to stand for 5 min. Five mL of butan-2-ol are added, kept under rotary stirring for 20 min, centrifuged 10 min, and the non-precipitated acid extract transferred. The alkaline and acid extracts are evaporated to dryness using a Speed-Vac® (Thermo-Fisher, Les Ulis, France) and reconstituted in 100 µL of 50:50 methanol / 0.1% acetic acid in water by vortex agitation, just before high performance liquid chromatography / mass spectrometry analysis.

For the MRM method, we used the same extraction method except that we added 20 µL of internal standard (Metronidazole at 25 ng /µL) to 100 µL of initial samples.

Organic solvents and reagents were analytical grade. Acetic acid and methanol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis; USA).

2.5. Megazol incubation with human livermicrosomes(HLM)

HLM were purchased from Biopredic international (Rennes, France) as a pool of 55 individual preparations. Megazol stock solution (9g/L) was prepared in ACN/DMSO (50/50). Incubation

were conducted in TRIS-HCL buffer (0,1 M; pH 7,4) containing 10mM MgCl₂.HLM(0.5 mg/mL) were pre-incubated with megalol (100 & 500 μM) at 37°C during 5 minutes(Gilson Temperature Regulator 832 and Thermostatic Rack; Middleton, USA). The reaction was then initiated by the addition of the co substrate (2mM NADPH). Following 60 minutes at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 100μL of ice-cold acetonitrile. Samples were centrifuged for 5 minutes at 13 000 rpm and the supernatants stored at -20°C until analysis.

2.6. Separation of megalol metabolites by reverse-phase chromatography

The HPLC system consisted of a Shimadzu LC 10 ADvp pump with an SIL-Ht autoinjector and a CTO-10ASvp column oven. The chromatographic separation was performed on a Nucleosil C18 column (125 x 2.1 mm i.d., 100Å-5 μm, Macherey-Nagel; Germany). The flow rate was 0.2 mL/min. The mobile phase was a gradient of 0.1% acetic acid in water (A) and 0.1% acetic acid in methanol (B) programmed as follows: initial, 5% B, increased to 50% in 19 min, then increased to 100% B in 1.5 min, maintained at 100% for 2.5 min, and finally, decreased to 5% B in the last 10.5 min. The injection volume was 20μL except for samples prepared from urine (3μL).

2.7. Mass spectrometry analysis

Detection was carried out with a 4000 QTRAP hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) equipped with a Turbo Ion Spray electrospray ionization (ESI) source and controlled by the Analyst software version 1.5 (AB). Ionization was achieved with electrospray in the positive ionization mode with the following settings: ion spray voltage, 5500V; curtain gas, 15 arbitrary units; ion source gas 1 and 2, 20 and 30 arbitrary units, respectively; collision cell exit potential, 16V; declustering potential, 46V. For MRM transitions of megalol, CE settings were optimized at 25, 27 and 31 eV. For

MRM transitions of metabolites, CE settings were automatically set between 35 and 50 eV, depending on the compound (Table 1).

2.8. Data processing

The settings of the GUS (General Unknown Screening) procedure were previously reported in details (Sauvage *et al.* 2006, 2009)(Picard *et al.* 2009). Briefly, acquisition was performed in the IDA (Information-Dependant Acquisition) mode, in which MS/MS continuously switched between a survey scan acquired in the enhanced-MS mode and up to three dependent scans obtained in the enhanced product ion (EPI) scan mode.

The detection of the putative metabolites was carried out using the Analyst software. The total ion current chromatogram of urine samples from mice administered 80 mg/kg megazol was compared to those of the controls (0 mg/kg megazol) for additional peaks. Major daughters ions (n=2-3) in each preselected EPI scan were noted, and the corresponding precursor ion-to-daughter ion transitions were subsequently monitored in the MRM mode in the urines of the megazol (80 mg/kg) and control group in parallel for confirmation. The MRM (Multiple Reaction Monitoring) transitions of metronidazole (Internal Standard), megazol and potential metabolites were simultaneously monitored (Table 1).

(Insert table 1 here)

3. Results & discussion

3.1. Megazol efficacy

A chronic experimental model of HAT similar to that of Keita *et al.* (1997) was developed because the original study aimed to explore a megazol effective minimal dose (EMD) between

80 to 10 mg/kg. We tentatively found an EMD ranging between 60 and 20 mg/kg (data not shown), but more homogeneous groups of animals are needed to confirm this preliminary result.

3.2. Characterization of megazol metabolites

Extracted by 2-butanol in either alkaline medium for the most or acid medium for the rest of them, a total of thirteen megazol metabolites are detected in mouse urine by the GUS method. According to the MS losses and the chromatographic mobilities, the compounds tentatively proposed are divided into the four phase I metabolites **1**, **3**, **4** and **10** and the nine phase II metabolites grouped as **7-9** and **5a,b**, **6a,b** and **12a,b** split into isomers (Fig 1). Produced via one to three combined biotransformations targeting four preferred sites -NH_2 , CH_3 , and NO_2 with or without involvement of the imidazolyl conjugated π -bond (Scheme 1)– the detected phase I group results from either *N*-demethylation, CH_3 or NH_2 oxidation or NO_2 reduction or even imidazolyl π -bond epoxidation (Table 2). Except for conjugates **5a,b** and **6a,b** (Tables 2 and 3), the five remaining phase II metabolites **7-9** and **12a,b** (Table 4) correspond to non-detected parent phase I metabolites.

(Insert Fig 1 here)

(Insert Scheme 1 here)

Megazol phase I metabolites

The four metabolites **1**, **3**, **4** and **10** are generated by either demethylation or oxidation targeting a single site of the parent drug (Table 2). Desmethylmegazol (**1**) is characterized by $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ 213, corresponding to the difference of 14 Da with megazol $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ 227. Such a structure is in full agreement with the reverse phase HPLC elution order, pointing a higher mobility for the metabolite (T_r 14.46 min), more polar than the parent compound (T_r 18.58 min) which is obviously slowed down by the original methyl group. The next three metabolites are oxymegazol isomers **3**, **4** and either **10**

or **11**, all exhibiting the same m/z 243 value for $[M+H]^+$. Discrimination between them is based on both, the evident wide range chromatographic mobility induced by the extra hydroxyl group for two of them and the MS direct loss of either 15, 17 or 18 Da. In comparison with **4** (T_r 12.14 min) and **10** or **11** (T_r 15.03 min), metabolite **3** (T_r 8.58 min) which is eluted faster, must have distant OH and NH_2 polar groups to enhance aqueous solvation. Then come in elution order, hydroxylamine **4** followed by either epoxide **10** or sulfoxide **11**. Indeed, unlike the former compound that features side by side polar groups, the latter two have only the original free NH_2 . This elution order is confirmed by the primary MS loss corresponding to each isomer. Indeed, demethylation which does not occur for megazol, can only develop if the heterocycle attractive effect is enhanced as in epoxide **10** only. Thus the sulfoxide **11** hypothesis is ruled out. Moreover, in comparison with megazol, hydroxylamine **4** cannot be also subjected to demethylation. Without free NH_2 group, it can only lose a molecule of water. Consequently, among the two alternatives –dehydration or deamination– the remaining ammonia loss must occur for oxymegazol **3**. Very particular, the latter behavior that promotes the removal of the nitrogen molecule by using a conjugated amino group may be the consequence of H-bond between the very close hydroxymethyl and nitro groups. Under these conditions, dehydration seems to be disadvantaged for the reported metabolite.

(Insert table 2 here)

Megazol phase II metabolites

Currently, conjugation reactions occurring with glucuronic acid, glutamic acid, serine and acetic acid respectively, result in nine metabolites among which three pairs of isomers with either a glucuronyl or a glutamyl residue: **5a,b** (Table 2), **6a,b** (Table 3) and **12a,b** (Table 4). Except for oxymegazol **3**, the parent phase I metabolites of **7-9** and **12a,b** are not detected at the present time.

Metabolites **5a,b** $[M+H]^+ m/z$ 403 and **6a,b** $[M+H]^+ m/z$ 419, each exhibits abundant daughter ion $[M+H-176]^+$ arising from the characteristic neutral loss of anhydroglucuronic acid. The m/z 227 value for glucuronides **5a,b** $[M+H-176]^+$, corresponds well to a protonated megazol moiety providing like

protonated megazol itself the same fragment-ions. As the parent drug offers only the outer amino group to conjugation, the two isomers –major **5a** and minor **5b**– would appear to differ through the major pyrano- and the minor furanoglucuronyl parts. With 16 Da more, metabolites **6a,b** are deduced also be the pyrano- and the furanoglucuronides derived from one of the three reported oxymegazol isomers **3**, **4** or **10**. Oxymegazol**3** is selected according to the significant $[M+H-176-17]^+m/z$ 226 indicating the removal of ammonia by secondary fragmentation. Attachment of the glucuronyl unit to the amino group is then discarded in favor of the hydroxymethyl because, with an additional OH group, metabolites **6a,b** could not be much less polar than glucuronides **5a,b**. Such a lower mobility for them (**6a**: T_r 12.20 min; **6b**: T_r 14.74 min) when compared to that of **5a,b** (**5a**: T_r 6.57 min; **5b**: T_r 12.17 min), is in full agreement with reduced aqueous solvation due, once again, to intramolecular H-bond between the vicinal –glucuronyl and nitro– substituents. Without this structural feature, oxymegazol**3** (T_r 8.58 min) is obviously eluted off the column faster than conjugates **6a,b**.

(Insert table 3 & 4 here)

Metabolites **7** $[M+H]^+m/z$ 316 and **8** $[M+H]^+m/z$ 358, both show abundant daughter ion m/z 229 which gives the same fragmentation pattern in each case (Table 4). Besides $[M+H-87]^+m/z$ 229, metabolite **7** produces also $[M+H-87-33]^+m/z$ 196. Both metabolites neutral odd losses correspond well to nitrogen compounds, namely anhydroserine ($C_3H_5NO_2$) and hydroxylamine (H_3NO) respectively. With 2 Da more ($-CH_2+O$) than protonated megazol, the invisible phase I metabolite is determined to be adesmethylloxymegazol attached to a serine moiety. Thus, the two parts are consequently linked via an hydroxylamine function issued from the outer megazol NH_2 group. The only difference for metabolite **8** is in fact the amino acid residue identified with glutamic acid, according to $[M+H-129]^+m/z$ 229 pointing removal of anhydroglutamic acid ($C_5H_7NO_3$).

Metabolite **9** displays $[M+H]^+m/z$ 239 followed by $[M+H-42]^+m/z$ 197 (Table 4). The direct ketene loss is due to an acetyl group attached to a megazol backbone with 30 Da lower (CH_2O) than megazol itself. This part can only belong to a demethylated and deoxygenated megazol unit in which the

parent nitro group is reduced into nitroso. Although the outer amino group is more accessible than imidazolyl NH to acetylation, the latter site can also be a target for such a conjugation.

Like **8**, isomer conjugates **12a,b** $[M+H]^+ m/z$ 343 also include a glutamyl unit indicated by $[M+H-129]^+ m/z$ 214 (Table 4). The modified megazol part shows 13 Da less than megazol. This is consistent with subtraction of an exocyclic nitrogen atom coming from either the original nitro substituent or least likely from the amino group. As the latter function is required for attachment with the amino acid for either the major **12a** or the minor **12b**, the original nitro group is therefore replaced by a carbonyl and an hydroxyl. Such a transformation of the parent megazol –as depicted in Scheme 2– must go the route of the imidazolyl π -bond epoxidation followed by elimination of a nitrite anion, consequent to rearrangement of the epoxide into α -hydroxyketone in basic medium.

(Insert Scheme 2 here)

As a result, the reported megazol metabolites found in mice urine are formed via either a single biotransformation (Table 2) or two combined biotransformations (Table 3) and even three (Table 4). By decreasing order of importance, the substrate targets are the *N*-methyl group then the outer amino group followed far behind by the nitro group as well as the conjugated imidazolyl π -bond (Scheme 1). Metabolism of the *N*-methyl produces a total of seven metabolites when this target is subjected to either demethylation (metabolites **1** and **7-9**) or oxidation into *N*-hydroxymethyl (metabolite **3**) followed by conjugation with glucuronic acid (metabolites **6a,b**). In parallel, the amino substituent is involved in the production of six metabolites. Conversion is due to either direct conjugation with glucuronic acid (metabolites **5a,b**) or acetic acid after reduction of the nitro group into nitroso (metabolite **9**) or also to oxidation into hydroxylamine (metabolite **4**) then coupled to *N*-demethylation followed by conjugation with serine (metabolite **7**) or glutamic acid (metabolite **8**). Less invested than the two previous targets, the nitro substituent is implicated in the formation of only three metabolites by either the reduction into a nitroso function and then conjugation with acetic acid (metabolite **9**) or the total subtraction of the original group replaced by a α -

hydroxyketobifunction and then conjugation with glutamic acid (metabolites **12a,b**). Finally, imidazolyl π -bond peroxidation leads to the unique epoxide **10**, located upstream on the metabolic pathway leading to denitro conjugates **12a,b** (Scheme 2).

Except for glucuronic acid conjugates **5a,b** and **6a,b** most likely as water-soluble sodium carboxylates, megazol and the other listed metabolites are, according to their basicity, dissolved in 2-butanol after NaOH treatment of mice urine. However, analytes such megazol itself, acetic acid conjugate **9** as well as oxymegazol**3** are also found along with glucuronic acid conjugates **5a,b** and **6a,b** in the subsequent acidic 2-butanol fraction (Table 5). Thus, to avoid regardless of the pH, continuously finding the above-mentioned analytes into the organic phase, the extracting process requires improvement by carefully rinsing the alkali induced precipitate. Moreover, separation of phase I metabolites, generally less polar, of those of phase II, could be envisaged by sharing the alkaline aqueous sample with solvents of increasing polarity. In addition inversion of the original order, alkalization followed by acidification of the sample, could be of interest.

3.3. Relative peak area of megazol metabolites in mice samples

(Insert table 5 & 6 here)

As compared to the relative peak areas of ions 243 (T_r 8.9 min) and 239 which are almost 1.5-fold and twice that of megazol respectively in urine samples (**Table 5 & Table 6**), it's interesting to note that after a microsomal incubation we found the first one but not the second which is supposed to be the most abundant. . We suspect that ion 239 may be a specific mice metabolite due to inter-species metabolism pathway.

(Insert table 7 here)

Fourteen ions corresponding to megazol and metabolites were found in mice urine (**Table 7**). Only 7/14 of these ions were found in mice plasma (227; 213; 239; 343 (T_r 15.9 min); 343 (T_r 18.2 min); 403 (T_r 12.2 min); 419 (T_r 12.2min)). In HLM, some ions emerge slightly from the background noise: 227; 213 & 243 (T_r 8.9 min). These are only phase I metabolites because synthesis of second phase metabolites like glucuronidated products are not possible due to absence of UDP-glucuronosyltransferase substrate (i.e. UDP-glucuronic acid) in the incubation mix.

The comparative analysis of the metabolite/megazol ratios in the alkaline 2-butanol extract clearly shows the predominance of acetyl desmethyl desoxymegazol (**9**), a metabolite estimated at 194%, nothing in common with all other soluble species, ranged from 1% up to 17% only (Table 5).

However, the unknown ratio between the soluble megazol fraction in acidic 2-butanol and the one in alkaline 2-butanol does not allow establish a relative concentration rank order of all metabolites in both combined extracts.

As evidenced by faster HPLC elution for all the reported metabolites, such biotransformations occur first and foremost to enhance hydrophilicity for rapid elimination of the parent drug. The phase I metabolites group constituted by oxymegazol isomers **3**, **4**, **10** as well as desmethylmegazol (**1**) illustrates well the reverse-phase HPLC ascending elution order based on the polar group(s)/non-polar group(s) ratio and their relative arrangement inside the above mentioned molecules. Indeed, metabolite **3** ($\text{NH}_2 + \text{imidazolyl-N-CH}_2\text{OH}$; T_r 8.58 min) is eluted faster than the next **4** ($\text{NHOH} + \text{imidazolyl-N-CH}_3$; T_r 12.14 min), **1** ($\text{NH}_2 + \text{imidazolyl-NH}$; T_r 14.46 min) and finally **10** ($\text{NH}_2 + \text{imidazolyl-N-CH}_3 + \text{O}$; T_r 15.03 min), the epoxide in which the permanent nitro group is no longer conjugated to the lost imidazolyl π -bond. Conversely, given the multiplication and combination of biotransformations resulting in compounds subject to more complex variables in terms of polarity, the elution order of all the phase II metabolites is not as easy to establish as that of the preceding group. However, comparison of structurally close compounds such as pyranoglucuronides **5a** and **6a**

or amino acid conjugates **7**, **8** and **12a,b** facilitates the comparison of chromatographic behavior differences. Indeed, despite a methyl group, **5a** (NH-GlcA + imidazolylN-CH₃) is eluted off the column at 6.57 min, far faster than **6a** (NH₂ + imidazolylN-CH₂O-GlcA) slowed down to 12.20 min by reduced aqueous solvation, probably induced by intramolecular H-bond between the vicinal nitro and glucuronyl substituents. Unlike glucuronides **5a** and **6a**, conjugates **7** (*T_r* 10.50 min) and **8** (*T_r* 13.01 min) differ only by the amino acid moiety attached to the outer amino group as NH-*O*-Ser for **7** and NH-*O*-Glu for **8**. In this specific case, the length chain seems to be the predominant factor on the expressed chromatographic mobility. Indeed, to a short chain combined with a free alcohol group corresponds a fast elution as shown by the serine conjugate **7**. Conversely, a long chain even coupled with a free carboxy group induces a slow elution as recorded for glutamic acid conjugate **8**. Such mobility is further reduced for the next glutamic acid conjugates **12a,b** (*T_r* 15.94 and 18.22 min) according to the replacement of the polar imidazolyl nitro group by either (α -hydroxy ketone structure + NH-Glu) or (α -*O*-Glu ketone + NH₂). Moreover, despite a nitroso group instead of the original nitro function, the single acetic acid conjugate **9** (*T_r* 11.08 min) with currently unspecified *N*-Ac attachment and without extra polar group, is as expected close to serine conjugate **7** (*T_r* 10.50 min) according to shorter acetyl chain.

Application of LC-NMR to complex matrix as plant extracts and biological fluids has proved useful in the structural elucidation of eluates from various origins. When controlled, this very efficient method may be potentially interesting for detailed on-line structural analysis of megazol metabolites in mice. Indeed, it may help in confirming the preliminary results relative to oxymegazol isomers **3**, **4** and **10**, major pyrano- and minor furanoglucuronic acid conjugates **5a,b** and **6a,b**, serine conjugate **7**, glutamic acid conjugate **8** and especially in evidencing unambiguously the megazol backbone's substituted position by the acetyl in **9** and the glutamyl in **12a,b**.

4. Conclusion & prospects

The m/z ratio of the potential metabolites found here were not similar to those from Enanga *et al.* (2000). Indeed, the authors identified in primate urine 4 m/z ratio: one corresponded to megalol (227) and three to potential metabolites (255; 417 and 431). In rat urine, three ions (213, 227, 255) were characterized (personal data from B. Enanga, not published).

Regarding the pharmacological activity of all these metabolites, it is likely that all those coming from second phase metabolism would have less or even no therapeutic activity as compared to first phase ones. Indeed the second phase metabolites are more water soluble, quickly excreted and are less able to cross host (and presumably parasite) cellular membranes.

The 239 ion (conjugate **9**) is interesting because of its produced in high quantity but also because its ratio m/z is close to that of megalol (227). It might be a phase I metabolite with a potential therapeutic activity.

The m/z 239 ion results from reduction of nitro group rather than from other possible reactions. Biologically, de-methylation and acetylation reactions are frequent but desoxygenation of the nitro group is less usual as compared to the classic metabolism which tends to mono oxygen xenobiotics *via* cytochromes P450.

Using fragmentation mass spectra, the m/z 239 ion would be a nitroso derivative of megalol. Of note, the nitroso groups are known to be involved in mutagenicity phenomena (H. Bartch IKO, 2013) and could explain megalol's one.

However, if the structural hypothesis of 239 ion was validated, its absence in microsomal suspension, would confirm the results obtained by Morais Jr. *et al.* (Morais *et al.* 1998), suggesting that mutagenic metabolites of megalol in the blood stream are not generated by mammalian liver enzymes. The authors established that after megalol absorption, urines were more mutagenic than serum.

It appeared also interesting to know if this metabolite is closed to the rodent species because it is not found in HLM, and if other metabolites have therapeutic activities devoid of mutagenicity activities.

Nevertheless, methodology for ions research in plasma and in microsomal suspension has to be optimized to obtain more conclusive results.

An interesting path of exploration would be to perform a kinetic study by methodical tracking of each metabolite in plasma on many times.

The study of megazol metabolites opens the way to additional works for confirming our structural hypothesis, for synthesizing them and finally testing mutagenicity and trypanosomal activities by comparing with the parent drug.

5. Funding

This work was supported by grants from UMR INSERM 1094 and the Limousin Regional Council. BIOS Chemicals kindly synthesized the megazol for the study. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

6. Transparency declarations

I have read the journal's policy and have the following conflicts: B. Morvan is an employee of BIOS Chemicals. All other authors have declared that no competing interests exist.

1 7. references

2

- 3 1. Boda C, Enanga B, Dumet H et al. Plasma kinetics and efficacy of oral megalol treatment
4 in *Trypanosoma brucei brucei*-infected sheep. *Vet Parasitol* 2004;**121(3-4)**:213-23.
- 5 2. Ferreira RC, Ferreira LC. CL 64,855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug, is also
6 mutagenic in the Salmonella/microsome assay. *Memórias Inst Oswaldo Cruz* 1986;
7 **81(1)**:49-52.
- 8 3. Ferreira RC, Ferreira LC. Mutagenicity of CL 64855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi*
9 drug. *Mutat Res.* 1986; **171(1)**:11-5.
- 10 4. Poli P, Aline de Mello M, Buschini A et al. Cytotoxic and genotoxic effects of megalol, an
11 anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. *Biochem Pharmacol.*
12 2002; **64(11)**: 1617-27.
- 13 5. Nesslany F, Brugier S, Mouriès M-A et al. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations
14 induced by megalol. *Mutat Res.* 2004; **560(2)**: 147-58.
- 15 6. Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole. A therapeutic review and update.
16 *Drugs.* 1997; **54(5)**: 679-708.
- 17 7. Sardi JCO, Almeida AMF, Mendes Giannini MJS. New antimicrobial therapies used
18 against fungi present in subgingival sites--a brief review. *Arch Oral Biol.* 2011; **56(10)**:
19 951-9.
- 20 8. Torreele E, Bourdin Trunz B, Tweats D et al. Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug
21 candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl*
22 *Trop Dis.* 2010;**4(12)**:e923.
- 23 9. Brun R, Don R, Jacobs RT et al. Development of novel drugs for human African
24 trypanosomiasis. *Future Microbiol.* 2011;**6(6)**: 677-91.
- 25 10. Kaiser M, Bray MA, Cal M et al. Antitrypanosomal activity of fexinidazole, a new oral
26 nitroimidazole drug candidate for treatment of sleeping sickness. *Antimicrob Agents*
27 *Chemother.* 2011;**55(12)**: 5602-8.
- 28 11. Morais Jr. MA de, Ferreira R de CC, Ferreira LC de S. Mutagenic activation of CL64,855,
29 an anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivat, by bacterial nitroreductases. *Genet Mol Biol*
30 [Internet]. 1998;**21(4)**. Available from:
31 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47571998000400026
- 32 12. Enanga B, Ndong JM, Boudra H et al. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of
33 megalol in a *Trypanosoma brucei gambiense* primate model of human African
34 trypanosomiasis. Preliminary study. *Arzneimittelforschung.* 2000; **50(2)**: 158-62.

- 35 13. Enanga B, Keita M, Chauvière G *et al.* Megazol combined with suramin: a chemotherapy
36 regimen which reversed the CNS pathology in a model of human African trypanosomiasis
37 in mice. *Trop Med Int Heal.* 1998; **3(9)**: 736-41.
- 38 14. Enanga B, Boudra H, Chauvière G *et al.* Pharmacokinetics, metabolism and excretion of
39 megazol, a new potent trypanocidal drug in animals. *Arzneimittelforschung.* 1999; **49(5)**:
40 441-7.
- 41 15. Chauvière G, Rousseau B, Pillon F *et al.* Synthesis of 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-[4-3H]-
42 2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole. *J Label Compd Radiopharm.* 1998; **41(1)**: 47-51.
- 43 16. Chauvière G, Bouteille B, Enanga B *et al.* Synthesis and biological activity of nitro
44 heterocycles analogous to megazol, a trypanocidal lead. *J Med Chem.* 2003; **46(3)**: 427-
45 40.
- 46 17. Enanga B, Labat C, Boudra H *et al.* Simple high-performance liquid chromatographic
47 method to analyse megazol in human and rat plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci App.*
48 1997; **696(2)**: 261-6.
- 49 18. Sauvage F-L, Saint-Marcoux F, Duretz B *et al.* Screening of drugs and toxic compounds
50 with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Clin Chem.*
51 2006; **52(9)**: 1735-42.
- 52 19. Picard N, Dridi D, Sauvage F-L *et al.* General unknown screening procedure for the
53 characterization of human drug metabolites: Application to loratadine phase I metabolism.
54 *J Sep Sci.* 2009; **32(13)**: 2209-17.
- 55 20. Sauvage F-L, Picard N, Saint-Marcoux F *et al.* General unknown screening procedure for
56 the characterization of human drug metabolites in forensic toxicology: applications and
57 constraints. *J Sep Sci.* 2009; **32(18)**: 3074-83.
- 58 21. Keita M, Bouteille B, Enanga B *et al.* Trypanosoma brucei brucei: a long-term model of
59 human African trypanosomiasis in mice, meningo-encephalitis, astrocytosis, and
60 neurological disorders. *Exp Parasitol.* 1997; **85(2)**: 183-92.
- 61 22. H. Bartsch IKO. Nitroso Compounds: Biological Mechanisms, Exposures and Cancer
62 Etiology (IARC Technical Reports) [Internet]. World Health Organization; 1992 [cited
63 2013 Apr 15]. Available from: <http://www.biblio.com/books/383294191.html>

64

65

66 **Legends to the tables :**

67

68 - **Table 1** : MRM transitions of megazol and of its metabolites

69 - **Table 2** : Proposed megazol metabolites generated by a single biotransformation in mice

70 - **Table 3** : Proposed megazol metabolites issued from two combined biotransformations in mice

71 - **Table 4** : Proposed megazol metabolites generated by three combined biotransformations in mice

72 - **Table 5** : Relative peak area of m/z metabolite by a urine alkaline extraction. min = minutes ;

73 cps = counts per second ; A_x/A_{227} = area of analyte on the reference area (megazol)

74

75 - **Table 6** : Relative peak area of m/z metabolite by a urine acid extraction. min = minutes ; cps

76 = counts per second ; A_x/A_{227} = area of analyte on the reference area (megazol)

77

78 - **Table 7** : Comparison of detected ions corresponding to megazol metabolites in mice urine and

79 plasma and in human hepatic incubation.

80

Table 1

Analyte	MRM transition (m/z)	CE ^a (eV)
Metronidazole (<i>m/z</i> 172)	172 → 128	21
Metronidazole (<i>m/z</i> 172)	172 → 98	50
Metronidazole (<i>m/z</i> 172)	172 → 82	35
Megazol (<i>m/z</i> 227)	227 → 181	27
Megazol (<i>m/z</i> 227)	227 → 197	25
Megazol (<i>m/z</i> 227)	227 → 154	31
<i>m/z</i> 213 at 14 min	213 → 196	35
<i>m/z</i> 213 at 14 min	213 → 167	35
<i>m/z</i> 213 at 14 min	213 → 127	35
<i>m/z</i> 243 at 8.9 min	243 → 226	35
<i>m/z</i> 243 at 8.9 min	243 → 168	35
<i>m/z</i> 243 at 8.9 min	243 → 141	35
<i>m/z</i> 243 at 12.2 min	243 → 184	50
<i>m/z</i> 243 at 12.2 min	243 → 127	50
<i>m/z</i> 243 at 12.2 min	243 → 114	50
<i>m/z</i> 243 at 15.1 min	243 → 228	35
<i>m/z</i> 243 at 15.1 min	243 → 213	35
<i>m/z</i> 243 at 15.1 min	243 → 157	35
<i>m/z</i> 403 at 6.7 and 12.5 min	403 → 181	50
<i>m/z</i> 403 at 6.7 and 12.5 min	403 → 269	35
<i>m/z</i> 403 at 6.7 and 12.5 min	403 → 227	35
<i>m/z</i> 419 at 12.2 and 14.9 min	419 → 157	50
<i>m/z</i> 419 at 12.2 and 14.9 min	419 → 243	35

<i>m/z</i> 419 at 12.2 and 14.9 min	419 → 170	35
<i>m/z</i> 239 at 10.9 min	239 → 197	35
<i>m/z</i> 239 at 10.9 min	239 → 141	35
<i>m/z</i> 239 at 10.9 min	239 → 123	35
<i>m/z</i> 316 at 10.3 min	316 → 229	35
<i>m/z</i> 316 at 10.3 min	316 → 196	35
<i>m/z</i> 316 at 10.3 min	316 → 141	35
<i>m/z</i> 358 at 13.1 min	358 → 141	50
<i>m/z</i> 358 at 13.1 min	358 → 229	35
<i>m/z</i> 358 at 13.1 min	358 → 196	50
<i>m/z</i> 343 at 15.4 and 17.5 min	343 → 214	35
<i>m/z</i> 343 at 15.4 and 17.5 min	343 → 140	50

81 ^a collision energy.

82

83

Table 2

Metabolites	[M+H] ⁺	Characteristic losses	R _t min	Biotransformations
1	213		14.46	<i>N</i> -CH ₃ demethylation
3	243	[M+H-17] ⁺	8.58	CH ₃ oxidation into CH ₂ OH
4	243	[M+H-18] ⁺	12.14	NH ₂ oxidation into NHOH
5a,b	403	[M+H-176] ⁺	6.57 and 12.17	NH ₂ conjugation with glucuronic acid
10	243	[M+H-15] ⁺	15.03	Imidazolyl- π -bond epoxidation

84

Metabolites	[M+H] ⁺	Characteristic losses	R _t min	Combined biotransformations
6a,b	419	[M+H-176] ⁺	12.20 and 14.74	i) CH ₃ oxidation into CH ₂ OH ii) CH ₂ OH conjugation with glucuronic acid

Table 4

Metabolites	[M+H] ⁺	Characteristic losses	R _t min	Combined biotransformations
7	316	[M+H-87] ⁺ [M+H-87-33] ⁺	10.50	i) <i>N</i> -CH ₃ demethylation ii) NH ₂ oxidation into NHOH iii) NHOH conjugation with serine
8	358	[M+H-129] ⁺ [M+H-129-33] ⁺	13.01	i) <i>N</i> -CH ₃ demethylation ii) NH ₂ oxidation into NHOH iii) NHOH conjugation with glutamic acid
9	239	[M+H-42] ⁺	11.08	i) <i>N</i> -CH ₃ demethylation ii) NO ₂ reduction into NO iii) NH ₂ or NH conjugation with acetic acid
12a,b	343	[M+H-129] ⁺	15.94 and 18.22	i) Imidazolyl- <i>π</i> -bond epoxidation ii) Nitrite anion elimination after epoxide rearrangement into α-hydroxyketone iii) NH ₂ or OH conjugation with glutamic acid

Table5

87

<i>Urine 80 mg/kg - butanol - NaOH</i>			
Ion	time (min)	Area (cps)	Ax / A227
227 (megazol)	18.6	7.15E+09	100%
239	11.1	1.39E+10	194%
243	8.9	1.20E+09	17%
358	13.0	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%

97

Table6

<i>Urine 80 mg/kg - butanol - HCl</i>			
Ion	time (min)	Area (cps)	Ax / A227
227 (megazol)	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%

104

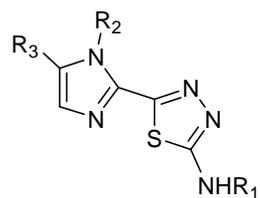
Ions	Mice urine	Mice plasma	Human hepatic incubation (500µMmegazol)
(retention time)			
227 megazol	✓	✓	✓
213	✓	✓	✓
239	✓	✓	
243 (8.9)	✓		✓
243 (12.2)	✓		
243 (15.1)	✓		
316	✓		
343 (15.9)	✓	✓	
343 (18.2)	✓	✓	
358	✓		
403 (6.6)	✓	✓	
403 (12.2)	✓		
419 (12.2)	✓	✓	
419 (14.7)	✓		

107 **Legend to the figure:**

108 **- fig 1:**Proposed deduced structures of megazol phase I and II metabolites in mice.

109

110

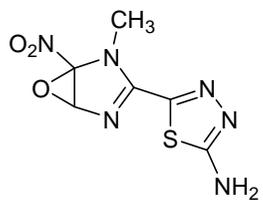


111

112 **1** $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = NO_2$ 113 **2** $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = NO_2$: Megazol114 **3** $R_1 = H$; $R_2 = CH_2OH$; $R_3 = NO_2$ 115 **4** $R_1 = OH$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = NO_2$ 116 **5a,b** $R_1 = GlcA$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = NO_2$ 117 **6a,b** $R_1 = H$; $R_2 = CH_2OGlcA$; $R_3 = NO_2$ 118 **7** $R_1 = OSer$; $R_2 = H$; $R_3 = NO_2$ 119 **8** $R_1 = OGlu$; $R_2 = H$; $R_3 = NO_2$ 120 **9** $R_1, R_2 = H, Ac$; $R_3 = NO$

121

122

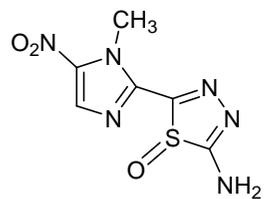


123

124 **10**

125

126

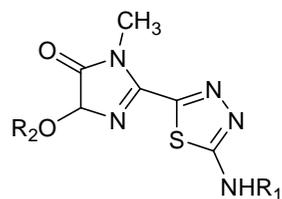


127

128 **11**

129

130



131

132 **12a,b** $R_1, R_2 = \text{H, Glu}$

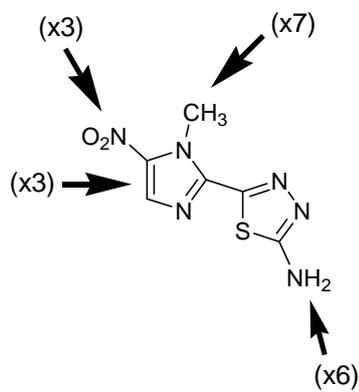
133

Fig1

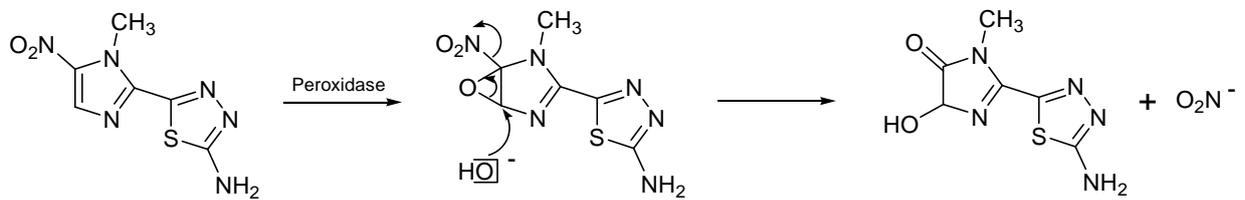
Legends to the schemes:

- **Scheme 1** :Megazol metabolism targets in mice and corresponding number of metabolites for each site.

- **Scheme 2** : A proposed two-step biotransformation of megazol into the non-detected phase I denitro -hydroxyketo metabolite precursor of conjugates 12a,b.



Scheme 1



Scheme 2

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.

Titre et résumé en Anglais

Trypanocidal activity of Megazol on two human and murine models, and identification of its metabolites

Human African Trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is an endemic vector-borne parasitic disease in sub-Saharan Africa. It is caused by a parasite called *Trypanosoma brucei* and transmitted through a tsetse fly (Glossine) bite during a blood meal. After multiplying within the blood and the lymph area the parasite crosses the blood-brain barrier and affects the central nervous system. At this stage, death is inevitable without treatment. Treatments available are stage-dependent and based on Pentamidine and Suramin for the bloodstream stage, and Melarsoprol and Eflornithine for the meningo-encephalic stage. Megazol, a nitro derivative, has anti-parasitic properties against this parasite that have been proved for a long time. Unfortunately, its study stopped after revelations concerning its mutagenicity were made.

Therefore our work first focused on the study of Megazol to determine its activity at a minimum tolerable dose and without significant adverse effects on a murine model by working on a range of concentrations from 20 to 60 mg/kg and by identifying metabolites. Next, we studied the kinetics of its metabolism at the level of human and murine hepatic microsomes, while searching for the potential metabolites produced.

The detection of these metabolites was made by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC/MS) in urine and plasma samples of the treated mice. Sixteen different ions were highlighted, some of them confirming the structure suggested in a previous study. Regarding the human and murine hepatic microsomes, the detection being too weak and the kinetics of metabolism not evolving raised questions about this study model validity.

There now remain to characterize all of the obtained metabolites and to test on *in vitro* parasite cultures their potentially trypanocidal effects in order to determine their interest, but also to reassess the toxicity of Megazol.

Key Words: Human African Trypanosomiasis, Megazol, metabolites, minimum tolerable dose, HPLC/MS

ACTIVITE TRYPANOCIDE DU MEGAZOL SUR DEUX MODELES HUMAINS ET MURINS, ET IDENTIFICATION DE SES METABOLITES

La Trypanosomose humaine africaine (THA), ou maladie du sommeil, est une parasitose vectorielle endémique localisée en Afrique sub-saharienne. Elle est causée par un parasite, *Trypanosoma brucei*, transmis par la piqûre d'une mouche, la glossine, lors de son repas sanguin. Le parasite après multiplication au niveau hémo-lymphatique est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique et d'atteindre le système nerveux central. A ce stade, en l'absence de traitement, la mort est inéluctable. Les traitements proposés sont stades dépendants et reposent sur la pentamidine et la suramine pour le stade hémo-lymphatique, le mélarsoprol et l'eflornithine pour le stade cérébral. Le mégazol, dérivé nitré, possède des propriétés antiparasitaires dirigées contre ce parasite depuis longtemps démontrées, malheureusement son étude a été stoppée à la suite de révélation concernant sa mutagénicité.

Notre travail s'est donc centré sur l'étude du mégazol, afin de déterminer son activité à une dose minimale tolérable et sans effet indésirable notable sur un modèle murin en travaillant sur une gamme de concentrations allant de 20 à 60 mg/kg et en identifiant les métabolites. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la cinétique de sa métabolisation au niveau de microsomes hépatiques humains et murins, tout en recherchant les éventuels métabolites produits.

La détection de ces métabolites a été effectuée par chromatographie liquide haute performance couplé à la spectrométrie de masse (CLHP/SM), dans des échantillons d'urine et de plasma des souris traitées. Seize ions différents ont été mis en évidence, dont certains ont permis de confirmer la structure proposée lors d'une précédente étude. Concernant les microsomes hépatiques humains et murins, la détection étant trop faible et la cinétique de la métabolisation n'évoluant pas, la question de ce modèle d'étude est donc discutable.

Il reste maintenant à caractériser l'ensemble des métabolites obtenus et à tester *in vitro* sur des cultures de parasite leurs effets potentiellement trypanocides afin de déterminer leur intérêt, mais également de réévaluer la toxicité du mégazol.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : Trypanosomose humaine africaine, Mégazol, métabolites, dose minimale tolérable, CLHP/SM.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Paul Sabatier, Toulouse III
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, chemin des Maraîchers,
31062 Toulouse cedex 04

Directeur de thèse : Docteur COURTIOUX Bertrand