ÉTUDE *IN VITRO* DE MÉDICAMENTS LEISHMANICIDES VECTORISÉS

M. DENIAU*, R. DURAND*, C. BORIES**, M. PAUL***, A. ASTIER***, P. COUVREUR****, R. HOUIN*

RÉSUMÉ

L'activité des principes actifs habituellement utilisés au cours des leishmanioses a pu être améliorée, en les incorporant à un vecteur.

Nous présentons un modèle *in vitro* permettant l'étude des interactions leishmanies-nanoparticules chargées ou non chargées. Ce travail a été réalisé avec deux types de nanoparticules : des nanosphères de polyisoalkylcyanoacrylate, vecteur particulière, biodégradable et des nanosphères de méthacrylate non chargées et chargées de pentamidine.

Le modèle associe la lignée mono-histiocytaire U937 et des formes amastigotes de *Leishmania major*. La méthodologie a consisté à

mettre en contact, des concentrations de l'ordre de 5 à 50 µg/ml pour les polyisoalkylcyanoacrylates et de 50 à 200 µg/ml pour les polymères de méthacrylate vis-à-vis de 3.10⁵ cellules infectées/ml ; l'efficacité des nanoparticules est évaluée 24 h plus tard en microscopie optique par mesure de l'index de l'infestation résiduelle.

Nous présentons ici les résultats des essais aux concentrations pour lesquelles nous obtenons une altération ou une disparition des leishmanies dans les vacuoles d'endocytose.

La validité et l'intérêt de ces résultats sont discutés.

SUMMARY: Study of action of loaded and unloaded drug carriers against leishmania in an *in vitro* model.

Antileishmanial chemotherapy is hampered by the location of parasites within lysosomal vacuoles of the macrophages which restricts the bioavailability of many potential antileishmanial compounds. In this study, the effectiveness of pentamidine targeted to the infected cells by a linkage to a colloidal drug carrier, methacrylate polymere nanoparticles was explored. In the same way, polyisoalkylcyanoacrylate nanospheres which have, *in vitro*, trypanolytic properties were also tested. The study was performed in an *in vitro* model using *Leishmania major* amastigote stages

within the U 937 human monohistiocytic cell line. The antileishmanial activities of unloaded or pentamidine-loaded nanoparticles were compared to those of the free drugs. The 50 % effective concentration of targeted pentamidine was 0.10 µg/ml, while it was up to 2.7 µg/ml with the free drug after a 24-hour incubation time. The pentamidine-bound nanoparticles proved to be 25 times more active than the free drug. Unloaded polyisoalkylcyanoacrylate nanoparticles destroyed intracellular amastigote stages (50 % EC = 15 µg/ml) but at a level close to the cytotoxic concentration.

Les leishmanies, parasites qui se multiplient sous forme amastigote dans les macrophages de l'hôte vertébré, sont depuis le début du siècle traitées, en première intention par les sels d'antimoine pentavalents.

Or, actuellement, les leishmanioses résistantes aux traitements usuels sont en constante augmentation : ceci peut être lié au caractère génétique de quelques souches, mais, surtout au terrain immunodéprimé de certains patients (Croft *et al.*, 1991 ; Thakur *et al.*, 1991). Ces résistances mettent en exergue la pauvreté de notre arsenal thérapeutique et notre méconnaissance du mode d'action de ces

médicaments. Parallèlement à la recherche de nouveaux médicaments, différents protocoles d'administration sont expérimentés ; ainsi la vectorisation particulière permet d'amener un produit leishmanicide connu dans la vacuole lysosomiale du macrophage parasité à l'aide d'une suspension colloïdale dont la taille des éléments varie entre 20 et 500 nm. Récemment, des leishmanioses viscérales poly-résistantes ont été mises en rémission complète (nous manquons de recul pour parler de guérison !) par l'injection de liposomes chargés d'amphotéricine B (Croft *et al.*, 1991). Actuellement il n'existe pas de vecteur colloïdal fixant les dérivés stibiés, mais on peut vectoriser la pentamidine à l'aide de nanoparticules de polymères de méthacrylate (Paul, 1990) afin d'essayer d'en améliorer l'efficacité et d'en diminuer la toxicité ; ce même principe a été récemment appliqué avec succès pour des substances anticancéreuses (Astier *et al.*, 1988, Chiannikulchai *et al.*, 1989) et des antibiotiques (Fatal *et al.*, 1989 ; Youssef *et al.*, 1988). De plus, une autre variété de nanoparticules constituées de polymères

* Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, Paris XII, 6, rue du Général-Sarrail, F 94010 Créteil.

** Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Paris XI.

*** Service de Pharmacie et Toxicologie, Hôpital Henri Mondor, Créteil.

**** Laboratoire de Pharmacie galénique et Biopharmacie, Faculté de Pharmacie, Paris XI.

Accepté le : 23 décembre 1992.

biodégradables de polyisobutylcyanoacrylate, a montré, *in vitro*, qu'elle détruisait les trypanosomes africains (Lherm *et al.*, 1987) et les amastigotes libres de leishmanies (Bories *et al.*, 1991).

Le but de ce travail est d'évaluer les possibilités thérapeutiques leishmanicides de ces deux polymères à l'aide d'un modèle *in vitro* combinant une lignée monohistiocytaire d'origine humaine et une souche de *Leishmania major*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

LE PARASITE

La souche de leishmanie nous a été transmise par le P^r Rioux. Elle a été isolée au Maroc sur *P. papatasi* et est identifiée comme *Leishmania major*, zymodème MON025 (IPAP/MA/86/LEM 898). Elle est habituellement entretenue sur milieu NNN mais repiquée, pour ce travail, sur milieu RPMI (RPMI 1640, Eurobio, France), tamponné par du bicarbonate, additionné de 20 % de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVF, D. A. P., France), de 20 % de milieu de Schneider (Schneider's drosophila medium, Gibco Ltd, U. K.), de L-glutamine (réf. 89531, Biomérieux, France), et d'antibiotiques usuels, à 27° C, avant la mise au contact des cultures cellulaires, ceci afin d'obtenir de grande quantité de formes promastigotes. Ces dernières atteignent leur phase stationnaire en 8 jours environ. Régulièrement la virulence de cette souche est contrôlée par passage sur hamster.

LIGNÉE CELLULAIRE

Elle provient d'un malade atteint d'un lymphome et a été isolée et caractérisée par Sundström et Nilsson en 1976.

C'est une lignée histiomonocytaire. Elle produit du lysozyme et de la bêta2-microglobuline. Elle possède une capacité de phagocytose relativement importante vis-à-vis des bactéries et des particules de latex. Leur temps de doublement est de 22 heures à 37°. Les cellules sont entretenues en milieu RPMI 1640, supplémenté par la L-glutamine, du SVF, des antibiotiques et tamponné par du bicarbonate, cultivées à 37° C dans l'air avec 5 % de CO₂. Elles se développent néanmoins correctement à 35° C, température à laquelle elles sont infestées par les leishmanies. Nous ne les différencions pas par le phorbol-myristate-acétate avant l'infection par le parasite, elles restent ainsi non adhérentes et continuent à se multiplier dans notre expérimentation. Cette lignée est utilisée depuis longtemps pour obtenir en culture continue (Berens *et al.*, 1979; Looker *et al.*, 1986) des formes amastigotes de leishmanies, mais dans ce cas elles sont différenciées.

INFECTION CELLULAIRE

L'infection s'effectue sous un rapport de 1 cellule pour 20 formes promastigotes en phase stationnaire, à 35° pendant 48 heures.

Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec le milieu de culture pour éliminer les formes extracellulaires restantes et les produits de métabolisme.

Elles sont repiquées chaque 48 heures à raison de 2,5.10⁵ cellules/ml. Un échantillon de 200 µl centrifugé (Cytospin, Shandon Ltd, Ireland) à 300 T/mn et coloré au Giemsa permet d'évaluer la qualité de l'infection. Une fois l'infection intracellulaire bien établie, la culture, après rinçage, est distribuée en plaques (Falcon 3046, Beckton Dickinson, USA). Chaque puits de 6 ml reçoit 3 ml de milieu de culture contenant 3.10⁵ cellules infectées/ml.

PRODUITS ÉVALUÉS

L'iséthionate de pentamidine est utilisé comme produit de référence (Rhône Poulenc, France) dilué avec du sérum physiologique.

Les nanoparticules de méthacrylate (fournies par le P^r Le Verge) sont chargées par du mésylate de pentamidine (Rhône Poulenc) dans le service de Pharmacie de l'Hôpital Henri-Mondor. Non chargées, elles mesurent 270 nm, chargées elle augmentent légèrement de taille : 350 nm (mesurées au Nanosizer, Coultronic, France) pour une charge de 50 nanomoles de pentamidine. Les suspensions chargées contiennent 50 nanomoles de pentamidine soit 17,01 µg de pentamidine base fixée sur 2.10¹¹ nanoparticules ce qui représente un volume de 1 ml. La fixation du principe actif se fait par liaison ionique sur des groupements -COOH libres du polymère. Les dilutions se font en tampon PBS (pH 7,4).

Les nanoparticules de polyisohexylcyanoacrylate ou de polyisobutylcyanoacrylate proviennent du laboratoire de galénique de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry; les suspensions titrent 10 mg/ml exprimés en polymère et contiennent 1,2.10¹² nanoparticules/ml avec des tailles comprises entre 100 et 200 nm. Les dilutions sont effectuées dans une solution isotonique de glucose à 5 %.

CYTOTOXICITÉ

La cytotoxicité des produits évalués sur les cellules U397 a été déterminée par la coloration vitale au bleu Trypan après 24 heures d'incubation; les résultats sont exprimés en concentration létale 50 % (fig. 1).

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ LEISHMANICIDE

Les dilutions sériées, de raison deux, ont été effectuées pour chaque produit. Les suspensions sont distribuées dans chaque puits sous un volume de 100 µl pour obtenir la concentration désirée. Sur chaque plaque de six puits, deux puits témoins non traités ne reçoivent que l'excipient, et il est réalisé deux puits par concentration. Les essais sont répétés trois fois. L'index d'infestation résiduelle (I. I. R.) est mesuré par microscopie optique après 24 et 48 heures de contact après cytocentrifugation et coloration par le Giemsa : le pourcentage de cellules infectées est compté sur 500 cellules sur chacun des puits. Les résultats sont exprimés en

Fig. 1. — Cytotoxicité des nanoparticules d'isobutylcyanoacrylate (IBCA) et d'isohexylcyanoacrylate (IHCA) vis-à-vis des cellules U937 après 24 heures d'incubation.

Concentration Efficace (CE) 50 % ou 90 % ce qui correspond à un % d'inhibition de l'infestation résiduelle de 50 % ou 90 % corrigée de l'infestation résiduelle des puits témoins, calculées après linéarisation du % de cellules infectées *versus* $\log_{10}$ de la concentration du produit évalué.

RÉSULTATS

CROISSANCE INTRACELLULAIRE DES AMASTIGOTES

Après 72 heures d'incubation, plus de 50 % des cellules contiennent des amastigotes (moyenne = 1,5 amastigotes/cellule). Nous avons observé des cellules avec un maximum de 20 amastigotes. Le parasitisme ne semble pas différencier les U937 puisqu'elles restent non adhérentes et continuent à se multiplier. Cette dernière propriété fait que, après 24 heures et 48 heures d'incubation, les pourcentages d'infestation résiduelle des puits témoins diminuent et soient respectivement 35 et 25 %.

EFFICACITÉ DES PRODUITS ÉVALUÉS

Après 24 heures ou 48 heures d'incubation, aux concentrations leishmanicides, la pentamidine libre n'a pas montré de cytotoxicité pour les cellules. Il en est de même pour les nanoparticules de méthacrylate non chargées jusqu'à la charge la plus forte évaluée, ce qui représente $1,6 \cdot 10^3$ nanoparticules/C U937 dans le milieu de culture. Par contre, les nanoparticules de PIHCA et PIBCA sont relativement cytotoxiques (*fig. 1*) *in vitro* avec une CE 50 % respectivement de 50 $\mu\text{g/ml}$ et de 20 $\mu\text{g/ml}$ (en polymère) soit $3 \cdot 10^8$ nanoparticules/ml, ce qui représente $20 \cdot 10^3$ /cellules, pour les IHCA et $2,4 \cdot 10^8$ /ml pour les IBCA soit $11 \cdot 10^3$ /cellule.

La recherche d'activité leishmanicide a été réalisée à des concentrations inférieures.

La pentamidine libre est efficace, en 24 heures, avec une CE 50 % = 2,7 $\mu\text{g/ml}$ (soit 4,6 μM) et une CE 90 % = 6,3 $\mu\text{g/ml}$ (soit 10,7 μM).

La pentamidine vectorisée se montre très active avec une CE 50 % à 24 heures = 0,10 $\mu\text{g/ml}$ (soit 0,19 μM), CE 90 % = 0,14 $\mu\text{g/ml}$ (soit 0,26 μM) (*fig. 2*). Cette activité leishmanicide est peu améliorée par un contact de 48 heures; dans ce cas, la CE 90 % se situe à 0,135 $\mu\text{g/ml}$ (soit 0,24 μM). De plus l'augmentation de la concentration de pentamidine vectorisée jusqu'à 0,28 $\mu\text{g/ml}$ (soit 0,52 μM) correspondant au double de la CE 90 % ne permet pas l'obtention d'une concentration efficace 100 % en 48 heures.

Les nanoparticules de PIHCA sont leishmanicides dès 5 $\mu\text{g/ml}$, avec un pourcentage d'inhibition de 20 %; la CE 50 % leishmanicide est de 15 $\mu\text{g/ml}$ mais à cette concentration, on note une altération de 20 % des cellules du support. Les nanoparticules d'IBCA sont aussi leishmanicides mais trop cytotoxiques pour permettre une détermination correcte de la CE 50 %.

FIG. 2. — Activité leishmanicide *in vitro* de la pentamidine libre et vectorisée par des nanoparticules de méthacrylate vis-à-vis des amastigotes de *Leishmania major* dans des cellules U937 après 24 heures d'incubation.

DISCUSSION

Le modèle utilisé présente plusieurs avantages; les cellules sont faciles à entretenir et il ne nécessite pas l'entretien d'animaux pour l'obtention de macrophages péritonéaux. De plus, les cellules macrophagiques obtenues par culture sont d'un état constant permettant l'obtention de résultats reproductibles. Lors d'essais préliminaires, nous avons évalué une lignée macrophagique d'origine murine, les J774, mais les cellules se sont révélées agressives vis-à-vis des amastigotes de notre souche de *Leishmania major*. Gaspar ne semble pas avoir eu ce problème en travaillant avec une souche de *L. donovani* (Gaspar *et al.*, 1992). La virulence de notre souche est régulièrement contrôlée par passage sur hamster.

L'infection des cellules est faite par des promastigotes et fournit des cellules infectées d'une qualité constante. Lors des essais d'infestation nous n'avons jamais dépassé trois repiquages de cellules infectées car le but n'est pas d'obtenir une culture continue de stades amastigotes. De plus, ces cellules non adhérentes sont d'un maniement facile et il est curieux de voir que le parasitisme n'altère pas leur multiplication lors des premiers repiquages.

Le choix d'une souche dermatrope peut apparaître, *a priori*, curieux pour évaluer une technique qui serait probablement plus applicable à des leishmanioses viscérales. La mise au point de ce modèle s'insère dans un programme plus vaste d'étude de cette souche. Nous avons vérifié la possibilité d'adapter ce modèle à d'autres souches et il s'est révélé compatible avec une souche de *L. infantum*, zymodème MON 1, isolé d'un patient sidéen, et une souche de *L. donovani*, aimablement fournie par S. Croft.

Sur ce modèle, la pentamidine a été trouvée active avec une CE 50 % = 2,7 µg/ml (4,6 µM) et ce chiffre est compris dans l'intervalle des valeurs de la pentamidine sérique mesurée chez l'homme pendant les traitements antileishmaniens, 1,5 à 9,4 µM ou 0,5-3,2 µg/ml (Bernard *et al.*, 1985).

L'activité leishmanicide des nanoparticules non chargées de méthacrylate est nulle à la plus forte charge évaluée. Ces nanoparticules ne sont que peu et très lentement biodégradables (Paul, 1990) et bien qu'elles soient phagocytées par les cellules (Astier *et al.*, 1988) (et arrivent au contact des leishmanies), leur présence dans les vacuoles lysosomiales n'a pas d'influence sur le parasitisme.

La pentamidine fixée par ce vecteur inerte a une activité remarquable. Les CE 50 % de la pentamidine après 24 heures d'incubation sont diminuées d'environ 25 fois, montrant par là l'intérêt de la vectorisation particulière de la pentamidine pour le traitement des leishmanioses.

Les nanoparticules de PIHCA et PIBCA présentent une activité leishmanicide intrinsèque (Bories *et al.*, 1991). Gaspar évoque la stimulation de la flambée respiratoire pour expliquer la destruction *in vitro* les amastigotes de leishmanies par ces nanoparticules. Mais d'autres Kinétoplastida tels que les formes trypomastigotes de *T. b. brucei* (Lherm *et al.*, 1987), de *T. cruzi* (Dr Serna comm. personnelle), *T. musculi*, formes promastigotes et amastigotes libres de *L. major* sont détruites par ces nanoparticules sans l'intervention du burst oxydatif ou de la voie des nitrites. Plus vraisemblablement, les polymères constituant les nanoparticules sont très rapidement bioérodés par les estérases des phagolysosomes (Lenaerts *et al.*, 1984) ou de la poche flagellaires (Streigers *et al.*, 1980) en acide cyanoacrylique plus toxique pour le parasite que pour la cellule. Le mode d'action cytotoxique ne pourra être précisé qu'après une étude en microscopie électronique. Les concentrations leishmanicides sont assez proches des concentrations toxiques pour les cellules mais ces biopolymères sont peu toxiques chez la souris ou l'homme injectés par voie i. v., rappelons qu'ils ont été utilisés dans différents modèles animaux vis-à-vis d'autres germes intracellulaires (Youssef *et al.*, 1988). Ils ouvrent la voie à un nouveau concept de médicament leishmanicide où c'est le vecteur qui par sa structure biodégradable se transforme en médicament parasiticide.

CONCLUSION

Nous avons réussi à montrer à l'aide d'un modèle original que la vectorisation de la pentamidine permettait d'augmenter la quantité de médicament arrivant au contact des leishmanies en diminuant les doses administrées. Le concept de la vectorisation particulières de molécules, ou de vecteur parasiticide est une voie qui mérite d'être explorée. À côté d'un intérêt thérapeutique immédiat, l'étude des mécanismes biologiques mis en jeu permettrait de mieux comprendre le rôle de chaque protagoniste au cours du traitement. La seule avancée thérapeutique notable de ces dernières années, est

l'emploi des liposomes de nouvelle génération chargés d'amphotéricine (Ambiosome®). Toutes les formes de vectorisation particulière possibles doivent être évaluées devant la montée prévisible, ces prochaines années, de cas de leishmanioses résistant aux thérapeutiques usuelles.

RÉFÉRENCES

1. Astier A., Doat B., Ferrer J. M., Benoit G., Fleury J., Rolland A., Le Verge R. : Enhancement of adriamycin antitumor activity by its binding with an intracellular sustained-release form, polymethacrylate nanospheres, in U-937 cells. *Cancer Res.*, 1988, 48, 1835-1841.
2. Berens R. L., Marr J. J. : Growth of *Leishmania donovani* amastigotes in a continuous macrophage-like cell culture. *J. Protozool.*, 1979, 26, 453-456.
3. Bernard E. M., Donnelly H. S., Maher M. P., Armstrong G. D. : Use of a new bioassay to study pentamidine pharmacokinetics. *J. Infect. Dis.*, 1985, 152, 750-752.
4. Bories C., Durand R., Deniau M., Vincendeau P., Loiseau P., Houin R., Gayral P., Bailland O., Couvreur P. : Nouvelles données sur la spécificité de l'effet antiparasitaire *in vitro* d'un vecteur particulière, les nanoparticules de cyanoacrylate d'isobutyle. *Bull. Soc. Franç. Parasitol.*, 1991, 9, 225-232.
5. Chiannikulchai N., Priouch Z., Benoit S. P., Parodi A. L., Couvreur P. : Doxorubicin-loaded nanoparticles; increased efficiency in murine hepatic metastases. *Select. Cancer Therap.*, 1989, 5, 96-106.
6. Croft S. L., Davidson R. N., Thornron E. A. : Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1991, 28, suppl. B, 111-118.
7. Fatal E., Youssef M., Couvreur P., Andremon A. : Treatment of experimental salmonellosis in mice with ampicillin-bound nanoparticles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, 33, 1540-1543.
8. Looker D. L., Martinez S., Horton J. M., Marr J. J. : Growth of *Leishmania donovani* amastigotes in the continuous human macrophages cell line U937: studies of drug efficacy and metabolism. *J. Infect. Dis.*, 1986, 154, 323-327.
9. Lenaerts V., Couvreur P., Christiaens-Leyh D., Joiris E., Roland M., Rollman B., Speiser P. : Degradation of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials*, 1984, 5, 65-68.
10. Lherm C., Couvreur P., Loiseau P., Bories C., Gayral P. : Unloaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: efficiency against bloodstream trypanosomes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 650-652.
11. Paul M. : Intérêt de nanoparticules de polyméthacrylate comme vecteur de médicaments administrés par nébulisation : exemple de la pentamidine. Mémoire de DEA de pharmacotechnie et biopharmacie, 1990, Université Paris XI.
12. Gaspar R. P., Opperdoes F. R., Preat V., Roland M. : Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles against intracellular *Leishmania donovani*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1992, 86, 41-49.
13. Steiger R. F., Opperdoes F. R., Bontemps J. : Subcellular fractionation of *T. brucei* bloodstream forms with special reference to hydrolase. *Eur. J. Biochem.*, 1980, 105, 163-175.
14. Sundström C., Nilsson K. : Establishment and characterization of a human histocytic lymphoma cell line (U937). *Int. J. Cancer*, 1976, 17, 565-577.
15. Thakur C. P., Kumar M., Pandey A. K. : Comparaison of regimens of treatment of antimony-resistant Kala-azar patients: a randomized study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991, 45, 435-441.
16. Youssef M., Fattal E., Alonso M. J., Roblot-Treupel L., Sauzieres J., Tancredd C., Omnes A., Couvreur P., Andremond A. : Effectiveness of nanoparticles-bound ampicillin in the treatment of *Listeria monocytogenes* infection in athimic nude mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, 32, 1204-1207.