



HAL
open science

Nano-assemblages à base de cyclodextrines modifiées chargés d'artémisinine pour le traitement du paludisme grave

Boumbewendin Yameogo

► **To cite this version:**

Boumbewendin Yameogo. Nano-assemblages à base de cyclodextrines modifiées chargés d'artémisinine pour le traitement du paludisme grave. Sciences agricoles. Université de Grenoble; 331 Université de Ouagadougou, 2012. Français. NNT : 2012GRENV011 . tel-00767116

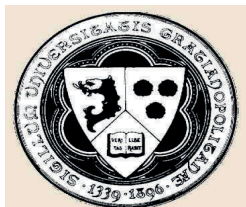
HAL Id: tel-00767116

<https://theses.hal.science/tel-00767116>

Submitted on 19 Dec 2012

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

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



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Sciences du médicament

Préparée dans le cadre d'une cotutelle entre
L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE ET L'UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

Arrêtés ministériels : 6 janvier 2005 - 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Boumbéwendin Gérard Josias YAMEOGO

le 23 mars 2012

Nano-assemblages à base de cyclodextrines modifiées chargés d'artémisinine pour le traitement du paludisme grave

Thèse dirigée par Denis WOUESSIDJEWÉ, codirigée par Rasmané SEMDE et encadrée par
Annabelle GEZE

JURY

- M. Innocent P. GUISSOU	Professeur, Université de Ouagadougou	- Président/Rapporteur
- Mme Sylviane LESIEUR	Directeur de Recherche cnrs, Université Paris 11	- Rapporteur
- Mme Gillian BARRATT	Directeur de Recherche cnrs, Université Paris 11	- Rapporteur
- Mme Delphine ALDEBERT	Maître de Conférences, Université de Grenoble 1	- Examineur
- Mme Léa PAYEN-GAY	Maître de conférences, Université de Lyon 1	- Examineur
- Mme Annabelle GEZE	Maître de Conférences, Université de Grenoble 1	- Encadrant de thèse
- M. Rasmané SEMDE	Professeur, Université de Ouagadougou	- Codirecteur de thèse
- M. Denis WOUESSIDJEWÉ	Professeur, Université de Grenoble 1	- Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du :

- Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM/UMR CNRS 5063, ICMG FR 2607, UFR de Pharmacie), Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant (ED 218), Université de Grenoble
- Département des Sciences Pharmaceutiques Appliquées, Ecole Doctorale Sciences de la Santé, Université de Ouagadougou.

À ma mère,

À mon épouse Martine Carine КАМБОУ,

À mes enfants Florine, Maëlys et Marie-Oria.

Je puis tout par Celui qui me fortifie!

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont encadré, soutenu, encouragé et/ou ont contribué de près ou de loin au bon déroulement et à l'évaluation de cette thèse.

Aux Professeurs Sylviane LESIEUR, Innocent Pierre GUISSOU et Gillian BARRATT : Merci pour avoir accepté la charge de rapporteurs et d'être membres de ce jury de thèse malgré vos impératifs professionnels.

Aux Docteurs Delphine ALDEBERT et Léa PAYEN-GAY, maître de conférences à l'UJF : Merci pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury en tant qu'examineur malgré vos multiples occupations.

Au Professeur Denis WOUESSIDJEWÉ :

Ma plus profonde gratitude. Merci de m'avoir accordé votre confiance et votre soutien depuis 2005, date à laquelle on s'est rencontré à Ouagadougou. Vous m'avez accueilli dans votre équipe comme dans votre famille. J'ai pu apprécier vos qualités humaines, votre gentillesse, votre humilité, votre grande générosité, votre disponibilité permanente et l'intérêt que vous accordé au travail bien fait. Puissiez-vous me pardonner pour mes maladresses à certains moments.

Au Professeur Rasmané SEMDE :

Ma profonde reconnaissance. Je vous remercie tout particulièrement pour avoir suivi mes pas depuis la 4^{ème} année de pharmacie à Ouagadougou, jusqu'à votre présence dans ce jury de thèse en tant que codirecteur. J'ai toujours été admiratif face à votre humilité et votre philosophie de vie. Merci pour votre confiance, votre encadrement et votre soutien permanent. Merci surtout d'avoir "supporté" mon caractère parfois impulsif durant ces longues années.

Au Docteur Annabelle GEZE

Mes plus vifs remerciements. Je vous remercie sincèrement pour l'encadrement scientifique de qualité dont j'ai pu bénéficier, pour l'accueil que vous m'avez réservé dans l'équipe et surtout pour le temps précieux que vous m'avez consacré. Votre investissement personnel, votre dynamisme, vos idées innovatrices et votre disponibilité sans faille sont les fondements de ce travail dans sa conception, son bon déroulement et dans l'élaboration du manuscrit de thèse et des différents articles de publication. Profonde estime et sincère reconnaissance.

Au Docteur Luc CHOISNARD :

J'ai particulièrement apprécié l'encadrement scientifique de qualité et la collaboration avec vous. J'ai appris beaucoup à vos côtés, notamment sur le plan technique analytique et sur le plan traitement statistique des données. Nos nombreuses discussions enrichissantes ont permis à certains moments de recadrer mon travail. Merci pour votre investissement personnel, votre disponibilité permanente et vos conseils.

A Christine BRUNET-MANQUAT :

Je ne peux oublier ta gentillesse, ta grande disponibilité et ton aide technique précieuse. Tu m'as été d'un grand appui en prenant en mains certaines manip à chaque fois que je devais retourner au Burkina Faso. Merci pour ta contribution personnelle à la réalisation de cette thèse et pour ton amitié.

A Delphine LEVILLY :

Une dédicace spéciale pour toi, ma chérie. Merci pour ta gentillesse, pour toute l'attention que tu m'as portée, pour ta bonne humeur et pour les multiples présents offerts à mes filles. Merci également pour ta grande disponibilité, ta promptitude et ton efficacité dans les commandes de réactifs et pour les synthèses de cyclodextrines. Je n'oubli pas non plus nos nombreuses causeries sur la religion et sur la vie. Tu es un ange.

J'adresse également mes remerciements à tout le personnel du DPM pour leur sympathie. Je pense en particulier à Eric Peyrin (directeur du DPM), Ahcène Boumendjel, Jean-Luc Decout, Corinne, Antoine, Chantal, Pascale, Angèle, Madeleine, Valérie, Sandrine, Marine, Florence, Emmanuelle, Marie-Ange, Anne, Annick, Catherine, Yung-Sing, Annie...

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma sympathie aux autres étudiants thésards ou stagiaires que j'ai côtoyés au DPM. Merci particulièrement à Mustapha, Estelle, Tchu, Amèle, Roseline et Sania pour votre agréable compagnie, votre gentillesse et votre soutien.

Je ne saurais oublier les responsables et les membres des autres laboratoires qui m'ont accueillie pour la réalisation de certains essais et avec qui j'ai eu des relations privilégiées. Mes remerciements font en particulier :

Au Docteur Jean-Luc Putaux du CERMAV-Grenoble, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour sa précieuse collaboration non seulement dans les évaluations morphologiques et structurales, mais également dans les corrections des articles de publication. Merci pour votre gentillesse, votre finesse d'analyse, votre empathie et votre disponibilité permanente.

Au Professeur Catherine Passirani, Mademoiselle Nolwenn Lautram et Monsieur Jérôme Bejaud de l'Inserm U646 d'Angers. Merci pour votre précieuse collaboration et pour tous les privilèges dont j'ai pu bénéficier durant mon séjour à Angers.

Au Docteur Jean Luc Coll et madame Michelle Keramidas de l'Institut Albert Bonniot de Grenoble. Votre engagement personnel et surtout votre rigueur professionnelle, sont autant d'atouts qui nous ont orientés les études de biodistribution chez les souris.

Aux Professeurs Christophe Ribuot et Diane Godin-Ribuot et à Emeline Lemarie, Esther Ngom Lema Tong et Sandrine Cachot de l'équipe HP2-Inserm U 1042. Chacun en ce qui le concerne s'est engagé personnellement pour la réalisation de l'étude de pharmacocinétique. Sans la rigueur scientifique et l'investissement personnel de madame Ribuot, le dynamisme, la minutie et la ténacité d'Emeline, cette étude n'aura pas pu être conduite à terme. Merci également à Xavier Fonrose du CHU de Grenoble.

Aux Docteurs Sodiomon B. Sirima et Adama Gansané et monsieur Paul Lamoussa Ouattara du Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme de Ouagadougou. Merci pour votre collaboration précieuse.

Je tiens également à remercier certains de mes enseignants du Burkina Faso qui n'ont cessé de me soutenir. Je pense en particulier aux professeurs Innocent Pierre Guissou, Mamadou Sawadogo, Jean-Baptiste Nikiéma, Issa T. Somé et Jean Sakandé. Merci également au Dr Charles Sombié.

Je remercie la famille Wouessidjewe et la famille Ribuoat qui m'ont adopté à Grenoble et qui ont contribué à rendre mes séjours français agréables.

A mon jeune frère et "compagnon de lutte" à Grenoble, Frank Zongo. Merci pour ton soutien et les bons moments passés ensemble. Je te remercie particulièrement pour notre agréable collaboration toujours basée sur ce même enthousiasme communicatif.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux personnes qui me sont chères :

A ma mère. Merci pour tes prières, ton amour et le réconfort que tu me donne. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis.

Mon épouse, Martine Carine Kambou. Je tiens à te témoigner mon amour et surtout ma reconnaissance pour les sacrifices personnels que tu as consentis pour me permettre de réaliser ce travail dans la quiétude et dans l'harmonie. Merci pour ton soutien affectif et moral, ta compréhension et ton amour. Puisse Dieu nous donner de vivre encore de bons moments avec nos adorables enfants.

A mes trois pupuces, Florine, Maëlys et Marie-Oria. Merci pour votre patience. "Papa, tu pars encore", "Papa tu as trop duré", "Reviens vite papa" ..., tant d'expressions qui témoignent de votre attachement à votre père et qui me donnaient parfois des remords mais également du courage. Papa vous aime. Puisse Dieu vous accorder beaucoup de grâces.

A mon oncle Antoine Wiougou YAMEOGO (In Memoriam). Alors que je rêvais d'être grand économiste comme toi, tu m'as orienté vers ce que tu aurais aimé être, pharmacien chercheur. Merci de m'avoir pris chez toi comme ton fils et de me donner autant d'amour paternel et de confort.

A mon père (In Memoriam). Je n'ai aucun souvenir de toi parce que tu es parti très tôt de ce monde alors que je n'avais que trois ans. Je sais que tu me guide de la haut.

Merci à mes frères et sœurs, à mes ami(e)s et à mes collègues de service de la Direction Générale de la Pharmacie, du Médicament et des Laboratoires du Burkina Faso qui m'ont soutenu et encouragé et qui continuent à le faire, de près ou de loin.

Enfin, je remercie la coopération française pour m'avoir permis de réaliser cette thèse en m'octroyant une allocation d'études.

SOMMAIRE

Avant propos

Liste des sigles et abréviations utilisés

Index des illustrations

Introduction générale	1
1. Le paludisme	1
2. Le cycle de développement biologique du <i>Plasmodium</i>	2
3. Les principales manifestations cliniques du paludisme	5
4. Les stratégies de lutte contre le paludisme	6
5. Les principales molécules antipaludiques	7
6. Les nouvelles stratégies thérapeutiques du paludisme	11
7. Notre étude : Objectifs, stratégies et justifications	17
Références	24
PREMIERE PARTIE : Revue bibliographique	30
Les systèmes nano-assemblées à base de cyclodextrines modifiées dans la vectorisation des substances bioactives. <i>Progress in developing amphiphilic cyclodextrins-based nano-devices for drug delivery.</i>	
DEUXIEME PARTIE : Publication des résultats	68
Publication de résultat n°1 : Etude de l'association de l'artémisinine aux nanoparticules de cyclodextrines bioestérifiées	69
<i>Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers. I: Formulation, lyoavailability and in vitro antimalarial activity assessment.</i>	
Publication de résultats n°2 : Evaluations biologiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des suspensions colloïdales	80
<i>Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers. II: in vitro behaviour toward the immune system and in vivo biodistribution assessments.</i>	
TROISIEME PARTIE : discussion générale	110
Formulations et caractérisations physicochimique et pharmacotechnique.....	112
Evaluations biologiques	126
Références	138
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	139
ANNEXES	141
RESUME	160

AVANT PROPOS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés en collaboration entre deux équipes du Nord et du Sud : l'équipe nanoparticules et vectorisation (ENANOV) du Département de Pharmacochimie Moléculaire, UFR de Pharmacie, Université Joseph Fourier de Grenoble et d'autre part le Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Technologies Pharmaceutiques du Département des Sciences Pharmaceutiques Appliquées, UFR Sciences de la Santé, Université de Ouagadougou.

Cette thèse a notamment permis :

- La formation dans le cadre d'une cotutelle, d'un docteur en sciences pharmaceutiques, qui à l'issue de la thèse, intégrera le corps des enseignants chercheurs de l'Université de Ouagadougou ;
- Le renforcement des échanges scientifiques entre deux équipes universitaires du Nord et du Sud.

La diffusion des résultats issus de ce travail de thèse a été faite à travers la participation à des séminaires et congrès scientifiques nationaux et internationaux ainsi que par les publications dans des revues scientifiques.

Articles soumis ou publiés dans des revues internationales à comité de lecture :

- Josias B.G. Yaméogo, Annabelle Gèze, Luc Choisnard, Jean-Luc Putaux, Catherine Passirani, Michelle Keramidas, Jean-Luc Coll, Rasmané Semdé, Denis Wouessidjewe, Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers. II: *in vitro* behaviour toward the immune system and *in vivo* biodistribution assessments, en préparation pour soumission à *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
- Josias B.G. Yaméogo, Annabelle Gèze, Luc Choisnard, Jean-Luc Putaux, Rasmané Semdé, Denis Wouessidjewe, Progress in developing amphiphilic cyclodextrin-based nano-devices for drug delivery, en préparation pour soumission à *Journal of Nanobiotechnology*.
- Josias B.G. Yaméogo, Annabelle Gèze, Luc Choisnard, Jean-Luc Putaux, Adama Gansané, Sodiomon B. Sirima, Rasmané Semdé, Denis Wouessidjewe, Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers. I: Formulation, lyoavailability and *in vitro* antimalarial activity assessment, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012, 80: 508-517.
- Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Cécile Vanharverbeke, Josias B.G. Yaméogo, Jean-Luc Putaux, Bernard Brasme, Laure Julien, Stéphanie Boulanger, Claire Elfakir, Denis Wouessidjewe, Physicochemical characterization of α , β and γ -Cyclodextrins Bioesterified with decanoate chains used as building blocks of colloidal nanoparticles, *Biomacromolecules* 2011, 12(8): 3031-3038.

Communication orale lors de congrès scientifiques :

Josias B.G. Yaméogo, Annabelle Gèze, Luc Choisnard, Jean-Luc Putaux, Rasmané Semdé, Denis Wouessidjewe, Injectable Artemisinin loaded nano-assembled systems made with biotransesterified γ -Cyclodextrins fatty esters (γ -CDC10), *Communication orale 3rd PharmSciFair 2011, Session Drug Discovery and Design: From Idea to Medicine*, Prague, République Tchèque, 13-17 juin 2011.

Communications affichées (Posters) lors de congrès scientifiques :

- Josias B.G. Yaméogo, Annabelle Gèze, Luc Choisnard, Jean-Luc Putaux, Christine Brunet-Manquat, Delphine Bakowski, Rasmané Semdé, Denis Wouessidjewe, Nano-systèmes à base de γ -Cyclodextrine Bioesterifiée chargés d'artémisinine pour le traitement du paludisme grave. *1ère Journée Scientifique du Médicament 2011, Grenoble*, 23 juin 2011.
- Jean-Luc Putaux, Annabelle Gèze, Josias B.G. Yaméogo, Luc Choisnard, Christine Brunet-Manquat, Delphine Bakowski, Yoshiharu Nishiyama, Bruno Jean, Cyrille Rochas, Denis Wouessidjewe, Ultrastructure de nanoparticules à base de cyclodextrines amphiphiles. *1ère Journée Scientifique du Médicament 2011, Grenoble*, 23 juin 2011.
- Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Cécile Vanharverbeke, Josias B.G. Yaméogo, Jean-Luc Putaux, Bernard Brasme, Laure Julien, Stéphanie Boulanger, Delphine Levilly, Claire Elfakir, Denis Wouessidjewe, Morphology and structure of nanoparticles directed by the physicochemical characteristics of building blocks bioesterified cyclodextrins. *1ère Journée Scientifique du Médicament 2011, Grenoble*, 23 juin 2011.
- Josias B.G. Yaméogo, Annabelle Gèze, Luc Choisnard, Jean Luc Putaux, Christine Brunet-Manquat, Delphine Levilly, Rasmané Semdé, Denis Wouessidjewe, Biotransesterified cyclodextrins based nanocarriers containing artemisinin: Formulations, bioavailability and in vitro antimalarial activity assessment. *Journées de Recherche Médicale 2011, Grenoble*, 15-16 avril 2011.
- Josias B.G. Yaméogo, Annabelle Gèze, Luc Choisnard, Jean Luc Putaux, Christine Brunet-Manquat, Delphine Levilly, Rasmané Semdé, Denis Wouessidjewe, Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as artemisinin nanocarriers. *15th International Cyclodextrin Symposium, Vienna*, 9-12 may 2010.
- Annabelle Gèze, Jean-Luc Putaux, Josias Yaméogo, Luc Choisnard, Yoshiharu Nishiyama, Bruno Jean, Cyrille Rochas, Denis Wouessidjewe, Structured nanoparticles from self-assembled cyclodextrins derivatives. *15th International Cyclodextrin Symposium, Vienna*, 9-12 may 2010.
- Josias Yaméogo, Annabelle Gèze, Luc Choisnard, Jean-Luc Putaux, Cyrille Rochas, Bruno Jean, Yoshiharu Nishiyama, Delphine Bakowski, Christine Brunet-Manquat, Denis Wouessidjewe, Assemblages supramoléculaires nanostructurés à base de cyclodextrines amphiphiles. *12^{èmes} Journées du Club Français des Cyclodextrines, Lyon* décembre 2009, pp53.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS UTILISES

ACT	Artemisinin-based combination therapy
ART	Artémisinine
BB	Benzoate de benzyle
CD/CDs/CDA	Cyclodextrine/Cyclodextrines/Cyclodextrine(s) amphiphile(s)
CH50	Capacité hémolytique 50 %
CI₅₀	Concentration inhibitrice 50 %
CLHP/HPLC	Chromatographie liquide haute performance
CMC	Concentration micellaire critique
CME	Ester de méthyle cellulose
Cryo-MET	Microscopie électronique par Cryo-Transmission
DEDL/ELSD	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DHA	Dihydroartémisinine
DiD	1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate
Dil	1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate
DMPE-mPEG	Dimyristoylphosphatidyléthanolamine-polyéthylène glycol
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DRX	Diffusion de rayons X
IV	Intraveineuse
MeOH	Méthanol
MS/SM	Spectrométrie de masse
MPS/SPM	Système des phagocytes mononucléés
NR	Nanoréservoirs
NS	Nanosphères
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PEG	Polyéthylène glycol
PBS	Phosphate buffer sodium (Tampon phosphate sodique)
p-LDH	<i>Plasmodium</i> -lactate déshydrogénase
POE	Polyoxyéthylène
PVDF	Fluorure de polyvynilidène
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
TEM/MET	Microscopie électronique à transmission
THF	Tétrahydrofuranne
SHN/NHS	Sérum humain normal
UV	Ultraviolet
VBS	Veronal buffer sodium (Tampon véronal sodique)

INDEX DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Introduction générale

- Figure 1** : cycle de vie du *Plasmodium falciparum* 5
- Figure 2** : structures chimiques de l'artémisinine et de ses principaux dérivés 8
- Figure 3** : schéma du mécanisme d'action de l'artémisinine et de ses dérivés 10

Discussion générale

- Figure 1** : spectre de masse MALDI-TOF du dérivé γ -CD-C₁₀ 113
- Figure 2** : schéma de la technique de nanopréciipitation 114
- Figure 3** : images de MET après coloration négative de nanosphères de α -CD-C₁₀, β -CD-C₁₀ et γ -CD-C₁₀ 117
- Figure 4** : images de MET après coloration négative et profils SAXS de nanoparticules de β -CD-C₁₀ avec des taux de substitution différents 118
- Figure 5** : représentation schématique des nanostructures de γ -CD-C₁₀ décorées en surface par des dérivés amphiphiles de PEG 121
- Figure 6** : profils de libération *in vitro* à 37°C de l'ART à partir des nano-systèmes réservoir et sphère dans l'eau distillée et dans le tampon phosphate sodique pH 7,4 124
- Figure 7** : structures chimiques du polysorbate 80 et du DMPE-mPEG2000 131
- Figures 8 et 9** : profils des concentrations plasmatiques moyennes de l'ART après administration intraveineuse des formulations nanoréservoir de γ -CD-C₁₀/Montanox[®] 80 (2 mg/kg), solution hydro-éthanolique d'ART (2 mg/kg) et nanosphère de γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000 133

LISTE DES TABLEAUX

Introduction générale

- Tableau I** : Les médicaments antipaludiques : mode d'action, effets et limites en thérapeutique 22
- Tableau II** : Les associations d'antipaludiques : action, effets et limites en thérapeutiques 23

Discussion générale

- Tableau I** : Caractéristiques des produits synthétisés estimées par dosage CLHP du décanoate de vinyle résiduel 113
- Tableau II** : Caractéristiques des nanosphères blanches (sans ART) préparées avec deux lots de synthèse différents de dérivés de α -, β - et γ -CD-C₁₀. 115
- Tableau III** : Paramètres pharmacocinétiques de l'artémisinine après administration intraveineuse des nanoréservoirs de γ -CD-C₁₀/Montanox 80 (2 mg/kg) et des nanosphères γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000 (1,5 mg/kg) 134

INTRODUCTION GENERALE

1. Le paludisme

Le paludisme, également appelé malaria est une maladie endémo-épidémique tropicale et intertropicale. C'est l'infection parasitaire la plus répandue dans le monde, notamment dans les pays d'Afrique tropicale au sud du Sahara avec 90 % des cas dus à *Plasmodium falciparum*. La classification épidémiologique des zones impaludées classe la zone afro-tropicale dans les aires continues de haute endémicité. Néanmoins, on y distingue selon l'altitude, le climat, la pluviométrie, le relief et le niveau d'urbanisation, des zones à transmission stable ou hyper-endémiques et des zones à transmission instable ou hypo-endémiques où le paludisme sévit de façon épidémique au moment des saisons des pluies (Bousema *et al.* 2011).

Plus de 100 pays sont touchés par cette maladie. On estime à environ 2,1 milliards le nombre de personnes exposées, environ 500 millions le nombre de personnes affectées et environ 3 millions le nombre de décès dus au paludisme chaque année. Cependant les statistiques recueillies en 2010 montrent que l'incidence du paludisme et les taux de mortalité dus au paludisme dans le monde ont été réduits respectivement de 17 % et de 25 % entre 2000 et 2010. En effet, les estimations de l'OMS en 2010 font état de (WAHO 2011a) 216 millions d'épisodes palustres dont 81 % en Afrique (174 millions de cas). Dans ces dernières statistiques, 66 500 cas de décès dus au paludisme ont été notifiés dont 91 % en Afrique. Egalement, 86 % des décès imputables au paludisme à l'échelle mondiale concernaient les enfants de moins de cinq ans.

En Afrique subsaharienne, le paludisme est le premier motif de consultation et d'hospitalisation. Elle est aussi la première cause de décès. Les victimes sont majoritairement les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes et les personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (Pv/VIH). On estime que le paludisme tue un enfant toutes les 30 secondes en Afrique (Impact malaria 2011). Au Burkina Faso par exemple, les statistiques recueillies auprès du ministère de la santé (MS-DGISS 2009) indiquent qu'en 2008, le paludisme était responsable dans les formations sanitaires de 43,8 % des motifs de consultation, 60,6 % des motifs d'hospitalisation et 40,4 % des décès. La population infantile de moins de cinq ans demeure la plus vulnérable : 52 % des motifs de consultation, 77,8 % des motifs d'hospitalisation et 65 % des décès. Egalement, la probabilité pour les femmes enceintes de développer la maladie est trois fois supérieure à celle des autres adultes au cours d'une épidémie de paludisme. Le paludisme provoque chez les femmes enceintes des avortements spontanés, des décès néonataux et des insuffisances pondérales pour les nouveau-nés (WHO 2011a).

Le paludisme est causé par un protozoaire parasite du genre *Plasmodium*. Cinq espèces plasmodiales pathogènes chez l'homme sont décrites : *Plasmodium falciparum* (responsable de formes neurologiques de paludisme, potentiellement mortelles en quelques jours), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale* (rare) et *Plasmodium knowlesi* (découvert récemment chez l'homme en Malaisie) (Impact malaria 2011).

La transmission est assurée par la piqûre d'un moustique du genre *Anopheles*, dont seule la femelle est hématophage. Deux complexes de vecteurs sont les plus rencontrés dans la transmission du paludisme chez l'homme : *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*. Cependant, *Anopheles gambiae* est la meilleure espèce vectrice du paludisme chez l'homme. C'est une espèce abondante qui vit habituellement à proximité des habitations humaines et pénètre volontiers dans ces habitations. Sa reproduction exige trois éléments fondamentaux qui sont le sang, l'eau et la chaleur. Ce tryptique explique l'absence de paludisme pendant la saison sèche ou froide selon la région, avec reprise respectivement à la saison des pluies ou à la saison chaude (Bousema *et al.* 2011). *Anopheles gambiae* privilégie le repas sanguin humain. L'ingestion de sang est nécessaire pour permettre à la femelle de compléter son propre cycle biologique y compris son développement ovarien et la ponte des œufs. L'infection d'un moustique par le *Plasmodium* affecte sa capacité à prendre un repas sanguin normal, probablement en endommageant ses glandes salivaires. Ceci aura pour conséquence un changement de son comportement l'entraînant à prendre des repas sanguins incomplets et plus fréquents, contribuant ainsi à augmenter la transmission (WHO 2011a).

A ce mode de transmission majoritaire par piqûre de moustique s'ajoutent des transmissions exceptionnelles par voie trans-placentaire (de la mère au fœtus) ou par la transfusion sanguine qui est grave car les trophozoïtes transmis sont directement infectants (WHO 2011a).

Le paludisme est une maladie à trois acteurs : le *Plasmodium*, essentiellement *P. falciparum*, agent du paludisme grave ; l'anophèle femelle, agent vecteur et l'homme, hôte réservoir infectant. Le cycle biologique du plasmodium nécessite l'organisme humain, où il se multiplie sous des formes asexuées (phase schizogonique), et l'organisme de l'anophèle femelle où a lieu la reproduction sexuée (phase sporogonique).

2. Le cycle de développement biologique du *Plasmodium*

Le cycle de vie du *Plasmodium* s'enclenche dès lors que l'anophèle femelle dont les glandes salivaires contiennent une forme du parasite appelée sporozoïte pique l'homme lors

d'un repas sanguin. Le moustique aspire alors un peu de sang tandis qu'il injecte à sa victime quelques sporozoïtes de *Plasmodium*. Les glandes salivaires d'un moustique infecté contiennent entre 10 000 et 200 000 sporozoïtes. Mais seul un petit nombre de ces sporozoïtes est retrouvé dans chaque gouttelette de salive injectée à l'hôte. Typiquement, une piqûre infectante contient entre 5 et 200 sporozoïtes, suffisants pour induire une infection. Les sporozoïtes injectés à l'homme circulent brièvement dans le sang avant de parvenir et se réfugier au foie en moins de 30 à 45 minutes (Impact malaria 2011).

Etape hépatique ou cycle exo-érythrocytaire chez l'homme :

Dans le foie, les sporozoïtes pénètrent dans les hépatocytes. Dans les cas d'infections à *P. vivax* et *P. ovale*, certains des sporozoïtes ne commencent pas leur division immédiatement après leur entrée dans l'hépatocyte. Ils restent à un stade quiescent appelé hypnozoïte de durée variant de plusieurs semaines à plusieurs mois. C'est ce qui explique comment une infection unique peut donner lieu à des vagues de parasitémie successives ou rechutes dans ces types de paludisme (WHO 2011a, Impact malaria 2011).

Dans les infections à *P. falciparum* et *P. malariae* les sporozoïtes passent directement par une phase de multiplication asexuée appelée *schizogonie exo-érythrocytaire* (ou pré-érythrocytaire) dans les cellules hépatiques. La durée de cette phase de maturation et le nombre de divisions nucléaires sont caractéristiques d'espèce (durée minimale de maturation de 5,5 jours chez *P. falciparum*). A la fin des divisions nucléaires, le cytoplasme se segmente et donne naissance à de gros schizontes tissulaires qui contiennent des milliers de mérozoïtes. Les hépatocytes infectés s'éclatent ensuite et libèrent les mérozoïtes qui se répandent dans le sang. Ces mérozoïtes, grâce aux organelles d'invasion qu'ils possèdent, vont reconnaître et envahir les érythrocytes.

Cycle érythrocytaire chez l'homme

Une fois dans les érythrocytes, les mérozoïtes perdent leurs organelles d'invasion et se différencient en trophozoïtes. Les trophozoïtes sont localisées dans des vacuoles parasitophores à l'intérieur du cytoplasme érythrocytaire. Le trophozoïte immature (appelé stade "en anneau", en raison de sa morphologie sur les frottis sanguins) grandit (trophozoïte mature) puis commence une série de divisions du noyau. Ces divisions vont aboutir à la formation de schizontes à l'intérieur des érythrocytes. Les schizontes digèrent une part importante de l'hémoglobine pour construire leurs propres protéines. Un schizonte mûr possède un nombre variable de mérozoïtes (ou schizozoïtes), qui est caractéristique de l'espèce (16-18 chez *P. falciparum*). Ces schizozoïtes vont être libérés dans le sang à la

suite de l'éclatement des hématies, envahir de nouvelles hématies et relancer un nouveau cycle (WHO 2011a, Impact malaria 2011).

Après plusieurs cycles, certains de ces parasites évoluent vers une forme sexuelle prédéterminée, les gamétocytes mâles et femelles. C'est l'étape de *gamétocyto-genèse* qui marque le début de la multiplication sexuée. Les gamétocytes circulent librement dans le sang périphérique sans provoquer de symptômes cliniques. Cependant, ils sont infectieux pour le moustique qui viendra piquer la personne infectée lors d'un prochain repas sanguin (WHO 2011a, Impact malaria 2011).

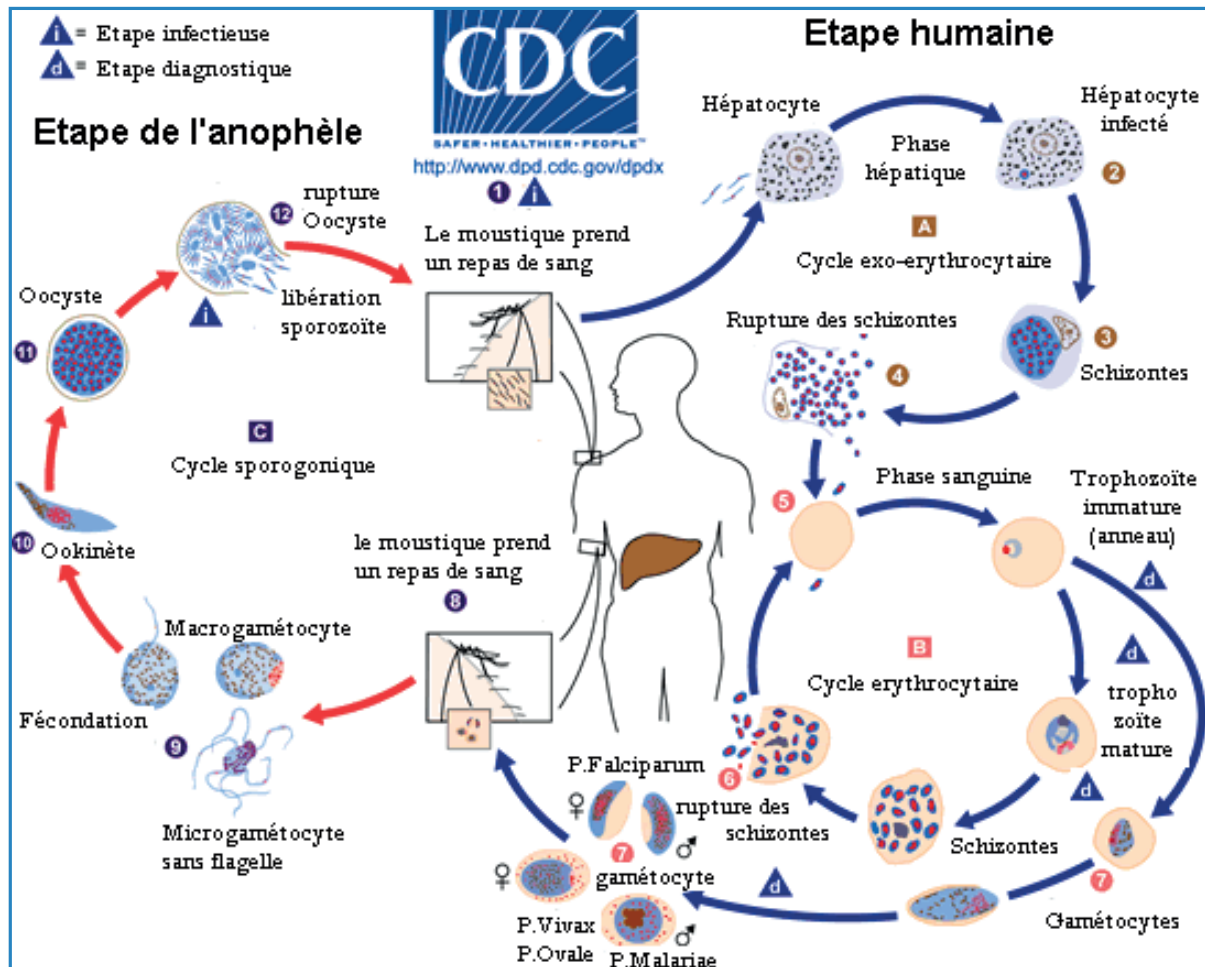
✚ Cycle sporogonique sexué chez l'anophèle

Après s'être gorgé sur un humain infecté, possédant des gamétocytes mûrs dans son sang périphérique, la femelle anophèle est à son tour infectée. Tous les autres stades parasitaires ingérés sont digérés dans l'estomac du moustique, à l'exception des gamétocytes. Les gamétocytes ingérés migrent dans le tube digestif du moustique et parviennent à l'intérieur de son intestin. Dans l'estomac du moustique, les gamétocytes se différencient soit en microgamètes soit en macrogamètes : c'est la *gamétogénèse* (WHO 2011a, Impact malaria 2011).

Les microgamètes vont par la suite féconder les macrogamètes et former après quelques heures un zygote mobile, appelé ookinète. Celui-ci pénètre à l'intérieur des cellules du tube digestif et s'enkyste entre la lame basale et la membrane plasmique. Il se forme un oocyste dont la principale source de nutriments est l'hémolymphe. Après une phase de développement, l'oocyste se rompt et libère des milliers de sporozoïtes qui migrent dans les glandes salivaires du moustique. Les sporozoïtes y restent environ une soixantaine de jours localisées dans une vacuole et se développent. Ils sont ensuite injectés à l'homme lors du prochain repas de l'insecte (WHO 2011a, Impact malaria 2011).

La figure 1 résume les différentes étapes du cycle de vie du *Plasmodium*.

Il est important de noter que le *Plasmodium* est un parasite intracellulaire pendant la plus grande partie de son cycle biologique. Des stades invasifs (extracellulaires) spécialisés sont cependant requis pour les transferts (du moustique à l'hôte vertébré, de l'hépatocyte à l'érythrocyte ou d'un érythrocyte à un autre) et la migration hors de l'estomac du moustique (WHO 2011a, Bousema *et al.* 2011). Contrairement aux stades invasifs, les stades intracellulaires ne possèdent pas d'organelles, mais possèdent par contre les structures nécessaires pour la respiration, l'ingestion et la digestion alimentaire.

Figure 1 : cycle de vie du *Plasmodium falciparum*.

3. Les principales manifestations cliniques du paludisme

Les manifestations cliniques du paludisme sont le résultat d'une cascade d'événements physiopathologiques influencés à la fois par le parasite et la susceptibilité de l'hôte. Les premiers signes cliniques (accès fébriles) apparaissent environ sept jours après l'infection dans le cas du paludisme à *P. falciparum*. Ce délai est plus long pour les autres espèces.

La libération des schizontes provoque des périodes de fièvres intenses dues à l'action de molécules parasitaires qui induisent la sécrétion de pyrogènes endogènes (WHO 2011a). Au cours des deux à trois jours précédant l'accès fébrile, le patient peut présenter des symptômes de fatigue, maux de tête, vertiges, nausées et vomissements. Les intervalles entre les accès fébriles sont déterminés par la longueur du cycle érythrocytaire de l'espèce plasmodiale impliquée. Ces intervalles sont de 48 heures pour les espèces *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce) et de 72 heures pour l'espèce *P. malariae* (fièvre quarte).

La digestion de l'hémoglobine et la destruction des hématies (hémolyse) conduit à une forte anémie chez les sujets porteurs.

Dans les paludismes à *P. falciparum*, l'accès peut évoluer rapidement vers une complication grave à type d'accès pernicieux, de syndromes neurologiques ou d'anémie grave. La survenue de ces manifestations est considérée comme une urgence médicale justifiant le plus haut niveau de soins disponible (WHO 2000). Dans la plupart des cas, le paludisme grave se développe à la suite d'un retard de traitement ou d'un traitement inadéquat. Cependant, on peut s'attendre à voir les premiers signes de paludisme grave apparaître trois à sept jours après le début de la maladie. Typiquement, trois différents syndromes sont décrits dans les formes de paludisme grave chez l'adulte ou chez l'enfant : syndromes neurologiques, anémie grave et détresse respiratoire. Cependant, chaque cas de paludisme grave représente en fait un mélange variable de ces trois syndromes (WHO 2000, Taylor *et al.* 2006).

Les formes neurologiques de paludisme consistent en des troubles de la conscience (ou "coma") en association avec une infection à *P. falciparum*. Elles commencent souvent par des convulsions multiples généralisées (associées de façon significative avec la morbidité et la survenue de séquelles) suivies de perte de conscience. Elle peut être fatale quelques heures après le début du coma même après instauration de traitement et de soins de réanimation adéquats. Chez l'enfant, le coma peut survenir très rapidement 48 heures environ après le début de la maladie. L'hypoglycémie et l'hyperthermie sont présentes dans la plupart des cas infantiles et augmentent le risque de convulsions et de coma. D'autres anomalies neurologiques, rétinienne et musculaires sont également associées et fréquentes. L'augmentation de la pression intracrânienne est une cause majeure de complications et est de mauvais pronostic (augmentation du risque de mortalité ou de séquelles neurologiques). La mortalité due au paludisme dans sa forme neurologique est entre 10 et 40 % et les séquelles neurologiques sont décrits dans environ 10 % des cas. Lorsque le patient atteint de formes neurologiques de paludisme reçoit un traitement rapide et adéquat, il récupère généralement très rapidement et de façon complète. Cependant, près de la moitié des cas de paludisme sévères non traités ont une issue fatale (WHO 2000).

4. Les stratégies de lutte contre le paludisme

Les efforts déployés pour lutter contre cette infection parasitaire sont contrariés par l'apparition et la propagation de résistances aux molécules antipaludiques qui étaient utilisées en première intention (WHO 2001). La résistance à un médicament est la capacité d'un germe à se développer et à se multiplier malgré l'administration de ce médicament aux

doses thérapeutiques recommandées (WHO 2004). En effet, le *Plasmodium* a développé une résistance très importante à la chloroquine (CQ) allant jusqu'à un niveau de 30 % par exemple au Burkina Faso. Les mécanismes de résistances sont variés et sont fonction de la molécule antipaludique. La résistance à la CQ est liée à une incapacité à accumuler la molécule dans la vacuole digestive parasitaire, probablement en raison d'un efflux de CQ (Le Bras *et al.* 2003, 2006).

Outre la lutte anti-vectorielle par l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action et la destruction des gîtes larvaires, les moyens de lutte existants sont les traitements préventifs et curatifs à base de médicaments dont les plus importants sont la quinine et l'artémisinine (ART) et ses dérivés (WHO 2011a, 2011b). La prévention du paludisme n'est recommandée que chez la femme enceinte par le traitement préventif intermittent (TPI) et chez les personnes non immunisées séjournant dans une zone d'endémie. Pour la prise en charge correcte et précoce des cas de paludisme, l'accent est mis sur la rapidité du diagnostic et l'instauration du traitement.

Le but visé dans le traitement curatif est d'éliminer le *Plasmodium* de l'organisme par l'administration de molécules antipaludiques. Une utilisation sélective des antipaludiques est recommandée de façon à réduire le risque de pharmacorésistance et de toxicité médicamenteuse. Au besoin, un traitement symptomatique peut être instauré.

La surveillance de la résistance est également une composante essentielle dans le cadre d'un programme national de lutte contre le paludisme. Les méthodes d'évaluation *in vivo* et *in vitro* de la chimiorésistance ont été standardisées par l'OMS pour l'espèce *P. falciparum* (WHO, 2004). Il est recommandé à chaque pays la révision de ses stratégies thérapeutiques antipaludiques lorsque le taux de résistance à la molécule utilisée est supérieur à 10 %.

5. Les principales molécules antipaludiques

Le *Plasmodium* dispose pour son développement intra-érythrocytaire d'un métabolisme et de moyens de défense spécifiques qui constituent les cibles des médicaments antipaludiques. Ces cibles plasmodiales sont (Lebrun-Vignes 1999, Martindale 2011) :

- la vacuole nutritive, siège de la digestion de l'hémoglobine, de la cristallisation de l'hème et où l'on retrouve des moyens de défense contre le stress oxydant,
- le cytoplasme, comportant le cytosol et deux organites essentiels, les mitochondries et l'apicoplaste, nécessaires à la biosynthèse des acides nucléiques.

- la membrane plasmique, constituée de phospholipides, de canaux calciques et parasitophores, qui est le siège du trafic nutritionnel.

La lutte pharmacologique contre le paludisme fait appel à de nombreuses molécules, aussi bien à visée prophylactique qu'à visée thérapeutique. Les médicaments utilisés sont principalement des schizonticides capables d'inhiber la prolifération des schizontes du sang (schizonticides sanguins) ou du foie (schizonticides tissulaires). Certains possèdent en plus, soit une action gamétocide, soit une action sporontocide. Les gamétocides détruisent les formes sexuées des parasites permettant ainsi d'interrompre la transmission de l'infection au moustique. Les sporonticides tuent les spores de *Plasmodium* au stade de la sporogonie (Martindale 2011).

Les médicaments antipaludiques peuvent être classés en deux catégories selon leur mode d'action : les schizonticides électifs et les inhibiteurs de l'acide nucléique. Les données sur l'ensemble des molécules antipaludiques sont résumées dans les tableaux I et II. Les connaissances du mode d'action, de la pharmacocinétique et de la toxicité de ces molécules permettent leur utilisation dans le respect de la balance bénéfice-risque.

L'ART et ses dérivés constituent une classe de molécules d'origine naturelle largement utilisée dans la prise en charge du paludisme dans les pays endémiques. Ce sont des lactones sesquiterpéniques avec un squelette de 1,2,4-trioxane (Figure 2). L'ART est extraite des feuilles d'*Artemisia annua* ou quinghao (Armoise annuelle), un arbuste de la pharmacopée traditionnelle chinoise. Elle est très active sur les souches multi-résistantes de *P. falciparum* (Van Agtmael *et al.* 1999). Cependant, son application clinique est limitée par sa faible solubilité en milieu aqueux, son temps de demi-vie plasmatique court et sa faible biodisponibilité par voie orale (Van Agtmael *et al.* 1999). De ce fait, ses dérivés d'hémi-synthèse à temps de demi-vie relativement plus longs et/ou plus actifs et plus efficaces sont plus utilisés. Il s'agit de la dihydro-artémisinine (DHA), des dérivés éthers liposolubles (artémether et artéether) et du dérivé ester hydrosoluble (artésunate).

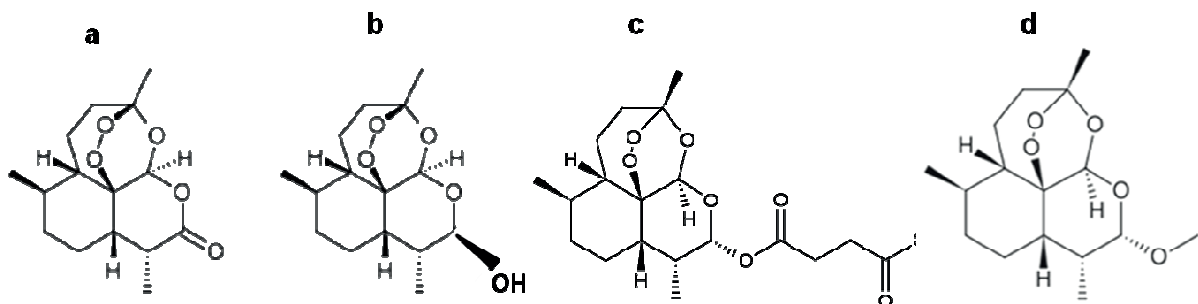


Figure 2 : Structures chimiques de l'artémisinine (a), et de ses principaux dérivés : dihydroartémisinine (b), artésunate (c) et artémether (d).

Tableau I : Les médicaments antipaludiques : mode d'action, effets et limites en thérapeutique.

Catégorie	Groupe chimique	Molécules	Mode d'action/Effets/Utilisations	Limites en thérapeutique
Schizonticides électifs	Amino-quinoléines	4-amino-quinoléines : Chloroquine (CQ)	activité schizonticide rapide et importante sur les formes sanguines asexuées de <i>P. ovale</i> et <i>P. malariae</i> , ainsi que sur les souches sensibles de <i>P. vivax</i> et <i>P. falciparum</i> . Action au niveau de la détoxification de l'hème (Lebrun-Vignes 1999). CQ : base faible lysosomotrope, traverse la membrane de l'érythrocyte et se concentre dans la vacuole digestive du parasite, BD après administration orale=78-89 %, Tmax 2-3 heures.	CQ : résistance à <i>P. falciparum</i> dans certains pays d'Afrique subsaharienne. N'est plus considérée comme thérapie efficace et adéquate du paludisme à <i>P. f.</i> dans ces zones. AQ : effets hématologiques et hépatiques, hépatites en utilisation prolongée : non recommandé en prophylaxie. Regain d'intérêt dans traitement curatif du paludisme non compliqué, ou elle est utilisée en association avec un dérivé de l'ART (WHO 2001, 2011b).
		Amodiaquine (AQ)	AQ : obtenue par modification structurale de la molécule de base de la chloroquine	
	Amino-alcools	8-amino-quinoléines : Primaquine	schizonticides tissulaires, très active sur formes intra-hépatiques. Effet gamétocytocide sur tous les <i>Plasmodium</i> . Efficace contre formes hépatiques quiescentes de <i>P. ovale</i> et <i>vivax</i> .	Très toxique, risques : neuropathie périphérique, hémolyse accrue, déficit en G6PD (non utilisable en routine) (Burgoine <i>et al.</i> 2010). Contre-indiquée : grossesse et enfant < 1 an.
		quinoléines-méthanol : Quinine (Q)	Amino-alcool : schizonticides sanguins, interfèrent avec l'utilisation de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du parasite. Quinoléines-méthanol : se concentrent moins que la chloroquine dans la vacuole digestive. Action implique autres sites non encore élucidés, mais pourrait concerner des protéines parasitaires sur lesquelles ils semblent se fixer.	Q : Action rapide et brève en IV directe, d'où utilisation dans la perfusion (solution glucosée isotonique à 5%) pour une infusion continue lente (WHO 2000, 2011b). Administration en IM fortement déconseillée à cause de multiples risques (atteinte nerveuse, douleur, abcès, contaminations diverses, etc.). Nombreux effets indésirables graves concentration-dépendants à type notamment de cinchonisme, toxicité métabolique hématologique, cardiaque et cutanées et effet abortive à fortes doses (Gottschall <i>et al.</i> 1991, Glynn <i>et al.</i> 1999, Lebrun-Vignes 1999, Taylor <i>et al.</i> 2004);
		Méfloquine (MQ)	Q : alcaloïde extrait des écorces de <i>Cinchona pubescens</i> , schizonticide sanguin plus toxique que la CQ, gamétocide pour <i>P. malariae</i> et <i>P. vivax</i> , aucune activité sur les gamétocytes de <i>P. falciparum</i> . Utilisée par voies orale, IV, IM ou rectale (Pussard <i>et al.</i> 2004, Barennes <i>et al.</i> 2006). Principale indication = traitement du paludisme sévère par voie IV de préférence, action rapide par voie IV : intérêt en urgence. voie ; orale = thérapie du paludisme simple chez la femme enceinte. Méfloquine, active sur formes sanguines asexuées de tous les <i>Plasmodium</i> et sur gamétocytes de <i>P. vivax</i> , <i>ovale</i> et <i>malariae</i> . Bonne activité sur les souches résistantes à la chloroquine.	MQ : nombreux effets secondaires limitant son utilisation. Action trop lente pour être utilisée dans les formes graves. Presque entièrement lié aux protéines sériques avec demi-vie d'élimination plasmatique de 15 et 30 jours en moyenne.
	Phénantrène-méthanol (Halofantrine) Dichlorobenzylidine (Luméfántrine)	Schizonticides sanguins, Activité sur souches de <i>P. falciparum</i> résistantes à CQ. Actif sur formes asexuées de tous les <i>Plasmodium</i> . Mode d'action peu étudié. Semble agir au niveau de la détoxification de l'hème. Existence d'autres sites d'action possible. luméfántrine = mélange racémique de dérivés fluorés, actif sur schizontes sanguins, T1/2 de 3 à 6 jours, éliminée lentement de l'organisme	Halofantrine : très liposoluble, absorption digestive très irrégulière, nombreux effets secondaires. contre indiqué chez la femme enceinte (embryotoxicité démontrée chez l'animal). Luméfántrine, meilleure biodisponibilité par voie buccale si prise avec repas riche en lipides, cas d'ulcères buccaux.	
Sesquiterpènes lactones	ART & dérivés : ART DHA Artésunate Artémether	Très efficaces sur souches de <i>P. falciparum</i> résistantes. Se concentrent dans les hématies parasitées. Interfèrent avec l'utilisation de l'hémoglobine par libération de radicaux libres en présence du fer hémique, entraîne lyse parasitaire intra-érythrocytaire rapide. Egalement inhibition de synthèse protéique plasmodiale. Action gamétocide. Guérissent paludisme à <i>falciparum</i> en 7 jours (WHO2001). ART : disponible forme orale ou intra-rectale (WHO 2001, 2007). Cl_{50} <i>in vitro</i> = 3-30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Lebrun-Vignes 1999). Voie rectale = efficace dans traitement du paludisme grave (WHO 2007). Cmax (prise orale unique de 500 mg)=200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Donne 4 métabolites inactifs, élimination rapide T1/2= 2 H (Lebrun-Vignes 1999). Artémether et Artéether = 2 fois plus actifs, tandis que la DHA et l'artésunate sont 4 à 5 fois plus puissants <i>in vitro</i> que l'ART (Lebrun-Vignes 1999). La DHA est un métabolite actif commun aux dérivés de l'ART, à l'exception de l'ART elle-même (Lebrun-Vignes 1999).	ART : très liposoluble, temps de demi-vie plasmatique trop court, effet de premier passage métabolique, action rapide et brève. Rapidement absorbée après prise orale mais de façon incomplète (BD relative de 32% par rapport à la forme IM). Artémether : très liposoluble, coût élevé, Artésunate : très instable en milieu aqueux et vis-à-vis de l'humidité de l'air ambiante	

inhibiteurs de l'acide nucléique	Sulfonamides = Antifoliques	Sulfadoxine, sulfaméthopyrazine, Sulfones	Antifoliques et antifoliniques = antifolates : agissent sur la synthèse des folates, essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques des parasites. Antifoliques inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui produit l'acide folique (Lu <i>et al.</i> 2010).	La faible efficacité, les effets secondaires et la sélection rapide de souches résistantes font que ces molécules sont utilisées généralement en association.
	Biguanides Diamino-pyrimidines	Proguanil, chlorproguanil Piriméthamine	Antifoliniques : inhibent la dihydrofolate réductase (DHFR) qui produit l'acide folinique (Bzik <i>et al.</i> 1987, Lu <i>et al.</i> 2010). La proguanil est une pro-drug du cycloguanil, molécule active <i>in vivo</i>	Proguanil : bonne tolérance mais taux de résistance élevé : réservé à la chimioprophylaxie. Conversion en cycloguanil réduite de 50 % chez femme enceinte (Lebrun-Vignes 1999) Piriméthamine, toxicité non-négligeable + résistances.
	Naphtoquinones	Hydroxynaphtoquinone (Atovaquone)	inhibiteur des fonctions mitochondriales : bloque la chaîne de transport mitochondrial des électrons au niveau de son enzyme clé, la dihydro-orotate déshydrogénase (DHODase).	Taux de rechute de 30 % en monothérapie. Effet antagoniste <i>in vitro</i> de celui des quinolones. Peu d'impact thérapeutique si utilisée seule.
	Cyclines & Macrolides		Antibiotiques : Inhibition synthèse protéique plasmodiale par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste. Activité sur formes sanguines asexuées de <i>Plasmodium</i> + Action sur formes primaires intra-hépatiques de <i>P. falciparum</i> .	Cyclines : activité énergétique mais lente

Action au niveau de la détoxification de l'hème : la dégradation de l'hémoglobine conduit à la formation d'un hème libre, toxique pour le parasite qui va lutter contre cette toxicité en polymérisant l'hème en cristaux d'hémozoin non toxique (pigment malarique insoluble). Les molécules comme la CQ agissent sur le processus de polymérisation, conduisant à une accumulation toxique d'hèmes puis lyse du parasite (Lebrun-Vignes 1999). BD = biodisponibilité, Cmax = concentration plasmatique maximale, Tmax = T1/2 = temps de demi-vie plasmatique.

Tableau II : Les associations d'antipaludiques : Action, effets et limites en thérapeutique.

Type d'association	Molécules	Mode d'action/Effets/Utilisations	Limites en thérapeutique
Associations à base d'antifolates	<i>Sulfadoxine-Piriméthamine (SP)</i>	combinaison d'un anti-folique (sulfadoxine) et d'un anti-folinique (pyriméthamine) ; activité schizonticide sanguine sur <i>P. falciparum</i> ; les deux constituants sont bien résorbés après administration par voie orale ; uniquement recommandée dans le traitement préventif intermittent (TPI) chez les femmes enceintes	T1/2 élevée (4 jours pour la pyriméthamine et 8 jours pour la sulfadoxine) + élimination très lente de l'organisme conduit à la sélection rapide de mutants résistants (Nwanyanwu <i>et al.</i> 1996, Mugittu <i>et al.</i> 2005). Activité anti-plasmodiale lente, intolérances cutanées rares mais graves type Lyell ou Stevens-Johnson
	Amodiaquine+SP	Alternative comme solution provisoire dans traitement curatif paludisme simple dans les situations où il est impossible de se procurer des ACT (WHO 2011)	
	proguanil-chloroquine proguanil-atovaquone	Utilisées dans la chimio-prophylaxie du voyageur. La combinaison atovaquone et proguanil donne une intéressante synergie d'action et une bonne tolérance clinique. Action également sur les stades hépatocytaires de <i>P. falciparum</i> .	Associations restant toutefois faiblement actives sur des souches fortement chloroquino-résistantes.
Associations à base d'ART : "Artemisinin-based Combination Therapy" (ACT)	Associations recommandées par l'OMS (WHO 2011b) : artéméter-luméfántrine artésunate-amodiaquine artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine artésunate-méfloquine.	Efficaces dans prise en charge des cas de paludisme simple (Kokwaro <i>et al.</i> 2007, Achan <i>et al.</i> 2009, Sinclair <i>et al.</i> 2009). Association per os dérivés de l'ART + antipaludiques à longue durée d'action permet de diminuer les rechutes et d'éviter l'apparition de résistance (Nosten <i>et al.</i> 2007, WHO 2011b). Différence de mode d'action des 2 molécules + pharmacocinétiques complémentaires : action synergique avec clairance rapide du parasite après un traitement de courte durée (Kokwaro <i>et al.</i> 2007). Guérison en 3 jours avec une adhérence plus élevée au traitement (WHO2001). Sécurité et tolérance prouvée sur populations vivant en zones d'endémie y compris chez les enfants (Falade <i>et al.</i> 2005, Hatz <i>et al.</i> 2007, Abulla <i>et al.</i> 2008). Artésunate-amodiaquine recommandée dans les zones où le taux de succès thérapeutique de l'amodiaquine en monothérapie est supérieur à 80%. Artésunate-SP recommandée dans les zones où le taux de succès thérapeutique de la SP en monothérapie est supérieur à 80% (WHO 2011b).	Usage en chimio-prophylaxie à proscrire en raison essentiellement de leurs caractéristiques pharmacocinétiques.

L'ART et ses dérivés sont utilisés, en fonction de la forme galénique, dans le traitement aussi bien du paludisme non compliqué que du paludisme grave. Ils agissent plus rapidement que les autres molécules antipaludiques et à des concentrations très faibles, sur les formes sanguines des *Plasmodium*. Leur mécanisme d'action est également différent de celui des autres antipaludiques (Lebrun-Vignes 1999, Van Agtmael *et al.* 1999).

En effet, l'ART et ses dérivés possèdent dans leur structure une fonction endoperoxyde essentiel pour leur activité antipaludique. Ils interfèrent avec l'utilisation de l'hémoglobine après réduction de la liaison peroxyde. La réduction est catalysée par la présence de l'ion fer (II) de l'hème. Elle conduit à la formation d'un radical alcoyle dont la fragmentation conduit à second radical de type alkyle. Ce dernier radical va alkyliser l'hème libéré lors de la dégradation de l'hémoglobine par le *Plasmodium* pour former des produits de couplage appelés adduits hème-artémisinine. Les radicaux alkyles peuvent également agir sur le processus de formation de l'hémozoïne à partir de l'hème soit en l'inhibant, soit en réduisant l'hémozoïne déjà formée (Figure 3). La scission de l'hémozoïne génère des composés électrophiles instables qui vont former une liaison covalente avec les protéines synthétisées par le parasite et interférer avec son métabolisme. Les membranes du parasite sont alors endommagées. Par conséquent, les vacuoles alimentaires libèrent dans le cytoplasme une enzyme hydrolytique qui provoque la mort du parasite (Lebrun-Vignes 1999, Van Agtmael *et al.* 1999, Bousejra *et al.* 2008).

L'ART et ses dérivés sont donc des schizonticides sanguins se comportant comme des agents alkylant après activation de la fonction peroxyde par l'hème réduit. Ils sont également actifs sur les gamétocytes, formes transmises de l'homme aux moustiques. Cette action gamétocide réduit la transmission et limite les risques de voir émerger des résistances (Martindale 2011).

Sur la base des données de la littérature, nous proposons à la figure 3, une représentation schématique du mécanisme d'action de l'ART et de ses dérivés.

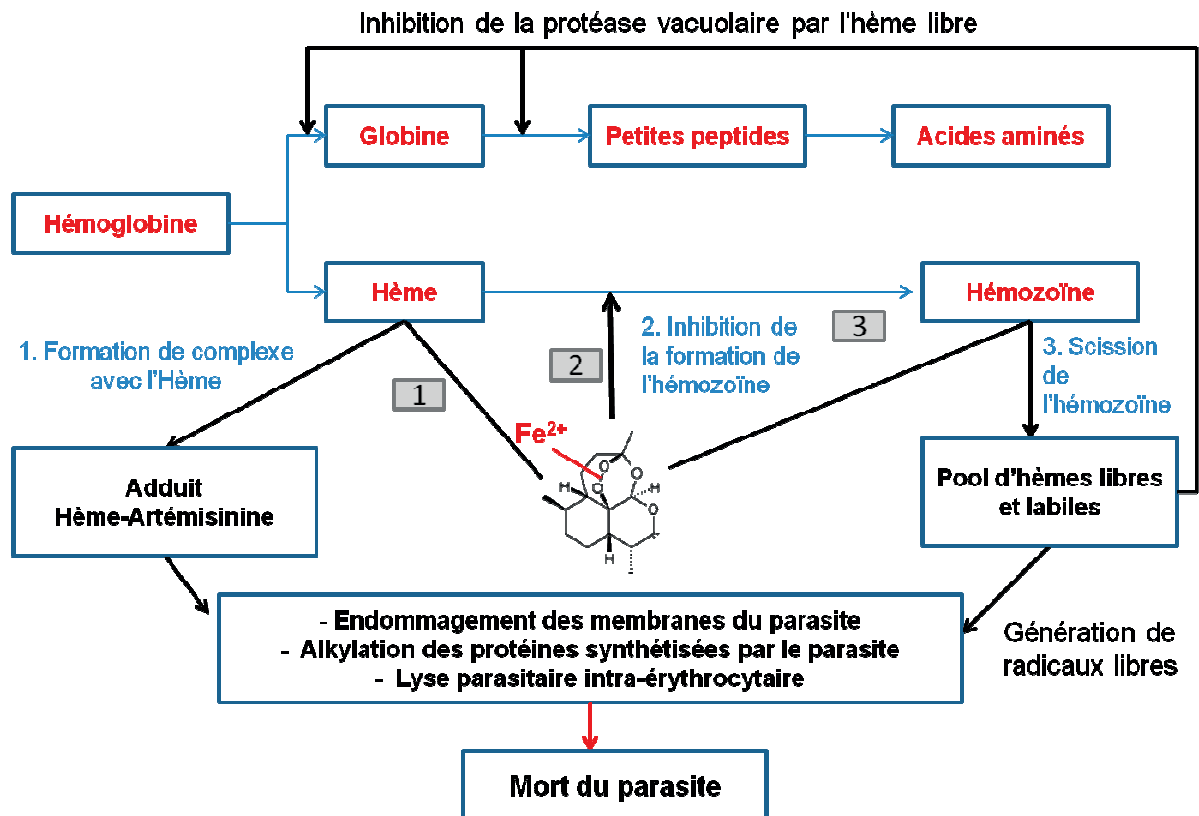


Figure 3 : Schéma du mécanisme d'action de l'artémisinine et de ses dérivés (adapté de Crespo-Ortiz and Wei 2012).

En monothérapie par voie orale, l'ART et ses dérivés ont montré une efficacité clinique et parasitologique rapide. Cependant, des recrudescences fréquentes de l'infection étaient observées dans les semaines qui suivent le traitement. Par conséquent ces molécules sont proposés en association à d'autres antipaludiques (Artemisinin-based Combination Therapy : ACT) pour la prise en charge par voie orale de l'accès palustre (WHO 2011b).

L'ART et ses dérivés sont très bien tolérés et les effets secondaires observés sont toujours rarement sévères (Martindale 2011). Aucune souche résistante ne semble avoir diffusé pour le moment, bien qu'une certaine décroissance de sensibilité ait été détectée *in vitro* dans certains pays (WHO 2001, 2011b, Le Bras *et al.* 2006).

L'ART et ses dérivés font également l'objet de recherches dans d'autres pathologies, telle que le cancer (Lai *et al.* 2005, Nakase *et al.* 2008, Crespo-Ortiz and Wei 2012) et d'autres maladies parasitaires (Keiser *et al.* 2007, Fathy *et al.* 2011).

Dans le cas du paludisme grave qui requiert un traitement par voie intraveineuse (IV), la quinine est recommandée (WHO 2000, 2011b) malgré ses effets secondaires très gênants de type cardiovasculaire et cinchonisme (acouphènes, vertiges, céphalées, troubles gastro-intestinales et de la vision, baisse de l'acuité auditive) notamment. Le développement de

formes IV à base des dérivés de l'ART qui sont relativement mieux tolérés, se heurte à des difficultés techniques majeures :

- i) l'artésunate est très instable en milieu aqueux neutre et peut subir rapidement des détériorations du type hydrolyse dues entre autre au contact avec l'humidité de l'air ambiant. Par conséquent, il n'existe que sous forme de poudre à reconstituer extemporanément dans une solution de bicarbonate de sodium à 5 % (m/v) pour administration IV. Il est cependant difficile de garantir la stabilité de cette forme dans les conditions tropicales à forte humidité relative ambiante (WHO 2011b) ;
- ii) l'artémether, du fait principalement de sa faible solubilité en milieu aqueux, n'existe qu'en voie intramusculaire (IM), alors qu'une forme IV est indispensable pour assurer une prise en charge rapide des cas de paludisme grave (Van Agtmael *et al.* 1999).

Néanmoins, l'artémether en IM et l'artésunate en IV constituent une deuxième ligne pour le traitement du paludisme grave (WHO 2000, 2011b, Newton *et al.* 2009).

6. Les nouvelles stratégies thérapeutiques du paludisme

De nombreuses recherches sont entreprises dans le monde dans l'optique d'optimiser la thérapeutique anti-palustre. De nouvelles stratégies sont développées dont certaines, en cours d'évaluation, promettent des lendemains meilleurs dans la lutte contre le paludisme. Parmi ces stratégies, nous pouvant citer : la recherche de nouvelles molécules, le développement d'un vaccin antipaludique et la mise en œuvre de nouvelles formes d'administration pour les molécules existantes.

Identification et développement de nouvelles molécules

Des progrès sont enregistrés dans l'identification et le développement de nouvelles molécules à travers des synthèses chimiques ou l'évaluation des plantes traditionnellement utilisées dans la prise en charge du paludisme. Le but étant d'offrir un choix plus large d'antipaludiques.

Les cibles de la plupart des nouvelles molécules antipaludiques sont identiques à celles des antipaludiques existant. Ces nouvelles molécules de synthèse sont souvent des analogues structuraux des antipaludiques existants. Elles possèdent soit une action sur les souches résistantes à la molécule mère, soit moins d'effets indésirables ou toxiques. C'est le cas par exemple des analogues 2,4-diaminopyrimidines de la pyriméthamine, en cours d'évaluation. Ces analogues se sont révélés être actifs sur les gènes mutants de

dihydrofolate réductase résistants à la pyriméthamine (Tarnchompo *et al.* 2002, Bunyarataphan *et al.* 2006).

D'autre part la compréhension du mécanisme d'action de l'ART et de ses dérivés a permis d'orienter certaines recherches vers la synthèse de nouvelles molécules de structure (endoperoxyde) et d'activité antipaludique semblables. Il est possible de citer les triaxones (Posner *et al.* 2003), les triaxoquines (Dechy-Cabaret *et al.* 2004, Bousejra *et al.* 2008) et les triaxoferroquines (Bellot *et al.* 2010). Ces molécules ont pour cible l'hème libéré lors de la digestion de l'hémoglobine par le parasite dans l'hématie infectée. Les triaxoquines sont des molécules hybrides associant un trioxane (alkylant de l'hème) et une aminoquinoléine (susceptible d'être accumulée dans le parasite) liés de manière covalente. Ces molécules ont montré une activité antiparasitaire remarquable aussi bien sur les souches chloroquino-sensibles que sur les souches chloroquino-résistantes. Des IC_{50} *in vitro* très faibles de l'ordre de 5 à 19 nM ont été rapportées pour ces molécules (Dechy-Cabaret *et al.* 2004, Benoit-Vical *et al.* 2007).

D'autres composants du *Plasmodium* sont également les cibles de certaines nouvelles molécules antipaludiques en cours de développement. Les chélateurs du fer, comme la desferrioxamine par exemple, ont montré une bonne activité antiparasitaire et semble être un adjuvant thérapeutique prometteur dans la prise en charge du paludisme sévère à *P. falciparum*. Les chélateurs agissent au niveau du cytosol par interaction avec le métabolisme du fer. Leur cible pourrait être la ribonucléotide réductase (RNRase), enzyme qui règle la synthèse de l'ADN (Gordeuk *et al.* 2002, Pradines *et al.* 2003, Weinberg *et al.* 2009). La membrane plasmique parasitaire est également la cible d'autres nouvelles molécules antipaludiques qui agissent en inhibant la synthèse de la phosphatidylcholine (principal phospholipide plasmodial) par la choline. Ces molécules bloquent le transporteur de la choline qui fournit au parasite un précurseur indispensable pour la synthèse des phospholipides membranaires du *Plasmodium* (Choubey *et al.* 2007).

Enfin, certaines nouvelles molécules de synthèse reversent la chloroquino-résistance chez *P. falciparum* en freinant la fuite de la CQ hors de l'hématie parasitée (Van Schalkwyk *et al.* 2006, Henry *et al.* 2006, 2008). Parmi ces nouvelles molécules figurent des dérivés de l'acridone. Ces dérivés comprennent un squelette acridone ayant des propriétés de ciblage de l'hème et des substituants chimio-sensibilisants permettant de contrecarrer les mécanismes de résistance aux molécules antipaludiques de type quinoléines (Kelly *et al.* 2009).

Les plantes sont également considérées comme une alternative intéressante pour l'identification de nouvelles molécules antipaludiques. Les substances actives issues des plantes ont toujours été largement utilisées dans le traitement du paludisme en médecine traditionnelle et jouent un rôle déterminant dans la gestion du paludisme en médecine conventionnelle. La quinine extraite de *Cinchona pubescens* et l'ART extrait d'*Artemisia annua* en sont les principales illustrations. Dans les stratégies de recherche en phytochimie, des extraits (Hilou *et al.* 2006, Traoré *et al.* 2008, Gansané *et al.* 2010) ou des composés chimiques isolés des plantes (Bero *et al.* 2011), de structures très variées, ont été évalués. Beaucoup de ces extraits ou composés chimiques isolés ont montré d'excellentes activités anti-plasmodiales *in vitro* à des concentrations souvent très faibles. Une autre approche dans a consisté à recenser les différentes espèces utilisées en médecine traditionnelle dans la prise en charge du paludisme (Adebayo *et al.* 2011).

Vers un vaccin contre le paludisme

Des efforts sont actuellement déployés pour le développement de vaccins contre le paludisme. En 2006, l'OMS a publié une « Feuille de route pour la technologie du vaccin antipaludique ». Les directives qui y figurent stipulent clairement que l'objectif majeur à atteindre est de développer un vaccin antipaludique ayant une efficacité protectrice supérieure à 50 % contre le paludisme grave et la mortalité liée aux accès palustres, sur une durée d'au moins un an (WHO 2006).

Plusieurs candidats vaccins (anti-sporozoïtaires ou dirigés contre d'autres formes du parasite) sont actuellement en cours d'évaluation clinique de phase Ia, Ib, II, ou III. Des résultats prometteurs et encourageants sont enregistrés avec certains candidats vaccins. On peut citer notamment, le candidat vaccin RTS,S/AS de GlaxoSmithKline (actuellement en phase III de développement clinique) et le candidat vaccin MSP3-LSP de Synprosis (en évaluation clinique de phase Ib au Burkina Faso).

Bien que de nombreux antigènes de *P. falciparum* aient été étudiés, les protéines parasitaires les plus utilisées dans l'élaboration des candidats vaccins sont surtout la protéine circumsporozoïte de *P. falciparum* (candidat vaccin RTS,S/AS) et la protéine 3 de surface du mérozoïte, un antigène associé à la membrane des formes parasitaires libres dans le sang (candidat MPS3-LSP).

Les résultats préliminaires obtenues avec ces candidats vaccins montrent des profils d'innocuité favorables et une bonne tolérance par les sujets adultes et infantiles (Sirima *et al.* 2009, Cohen *et al.* 2010, Sirima 2011). Des niveaux significatifs d'efficacité sont enregistrés avec le candidat vaccin RTS,S/AS. En effet, les résultats issus de la phase II des essais de

ce vaccin ont montré une efficacité de l'ordre de 53 % chez les jeunes enfants et de 65 % chez les nourrissons (Cohen *et al.* 2010). Les résultats préliminaires observés lors des essais du vaccin MPS3-LSP semblent plus significatifs, mais des études cliniques plus étendues doivent être menées pour confirmer son efficacité (Sirima 2011).

Ces candidats vaccins suscitent actuellement l'espoir dans la lutte contre le paludisme en Afrique.

Les nouveaux systèmes d'administration des antipaludiques

La recherche de nouvelles formulations plus adaptées pour l'administration des antipaludiques est également envisagée dans certaines recherches. Le but est d'optimiser l'efficacité thérapeutique des antipaludiques existants. Plus particulièrement, la mise en œuvre des nouvelles formes d'administration vise à améliorer la spécificité, la sensibilité, la tolérance (augmentation du confort du patient) ou l'index thérapeutique des antipaludiques. Ce qui permettra de mettre à la disposition du personnel soignant et des patients, des médicaments mieux tolérés et plus efficaces.

Les nouvelles stratégies d'administration étudiées dans ce sens incluent l'utilisation de nouvelles voies d'administration (transdermique, intra-nasale...) et de nouvelles formes pharmaceutiques (formes matricielles à libération contrôlée, implants, suspensions colloïdales pour administration IV).

Les voies alternatives d'administration des antipaludiques

Les voies alternatives actuellement explorées pour l'administration des antipaludiques sont les voies transdermique, rectale et pulmonaire.

L'administration transdermique a pour avantages notamment :

- d'éviter les variations d'absorption et de métabolisation associées à l'administration par la voie orale traditionnelle,
- d'éviter les risques et inconvénients de la voie IV,
- de permettre l'utilisation de principes actifs à demi-vie biologique courte grâce à un apport continu,
- d'éviter l'effet du premier passage hépatique,
- d'administrer des médicaments à index thérapeutique étroit grâce à la possibilité de régler le flux,
- d'améliorer la compliance des patients grâce au mode simplifié d'application,
- de permettre l'arrêt immédiat du traitement par simple retrait du dispositif.

Des approches ont été développées pour augmenter la pénétration percutanée du principe actif, principale limite de cette voie d'administration, permettant ainsi d'accroître les possibilités d'administration des médicaments par voie transdermique.

De nombreuses études sur l'administration transdermiques de molécules antipaludiques sont rapportées dans la littérature. Parmi les antipaludiques étudiés à cet effet, il est possible de citer, sans être exhaustif, la CQ, la primaquine (PQ) et l'ART et ses dérivés. En effet, des patchs à base de matrice hydrogel de pectines renfermant la CQ associée au DMSO comme promoteur d'absorption, ont été évalués chez le rat et ont mis en évidence une libération contrôlée de la CQ (Musabayane *et al.* 2003). Concernant la PQ, substance reconnue comme ayant beaucoup d'effets indésirables dose-dépendants, plusieurs matrices ont été examinées. Parmi ces matrices on peut citer les polymères d'Eudragit® RL 100, d'éthyle cellulose (Mayorga *et al.* 1997, 1998) ou l'amidon (Jeans *et al.* 1999, Heard *et al.* 2003) utilisant le Miglyol® 840 (triglycérides) comme promoteur d'absorption. Les études réalisées chez le rongeur (Mayorga *et al.* 1997, 1998, Heard *et al.* 2003) ou chez l'homme (Jeans *et al.* 1999) indiquent une libération contrôlée et prolongée (pouvant aller jusqu'à 40 heures) de la PQ, combinée à une bonne activité sur les formes asexuées de *Plasmodium* après application transdermique du principe actif associé à ces systèmes matriciels. Enfin, les matrices d'éthyle ou de méthyle cellulose associés au phtalate de diméthyle renfermant des dérivés de l'ART (acide artélinique, DHA, artésunate) ont également donné des résultats intéressants en termes d'élimination rapide du *Plasmodium* après administration transdermique chez la souris (Klayman *et al.* 1991, Lin *et al.* 1994, Zhou *et al.* 2003).

La voie intra-nasale a été étudiée comme méthode non-invasive de traitement du paludisme. La particularité de cette voie, est que la cavité nasale permet une délivrance directe du principe actif au cerveau via la membrane nasale (Graff and Pollack 2005). Ce qui peut être exploitée pour le traitement des formes neurologiques de paludisme. En plus, cette voie d'administration offre une grande surface d'absorption à certaines substances actives. Des études réalisées montrent une bonne efficacité de la DHA administrée par voie intra-nasale dans le traitement des infections à *Plasmodium* chez la souris (Touitou *et al.* 2006).

Cependant, il est important de signaler que cette voie d'administration possèdent des limites dont les plus importantes sont : l'élimination rapide du principe actif du site de dépôt suite à des dégradations enzymatiques ou à la clairance muco-ciliaire, la faible perméabilité de l'épithélium nasal et la biodisponibilité irrégulière (Costantino *et al.* 2005).

Les nouvelles formes pharmaceutiques d'antipaludiques

Les nouvelles formes pharmaceutiques étudiées à l'heure actuelle pour l'administration des antipaludiques peuvent être classées dans deux catégories : les formes implantables et les formes dispersées microniques et submicroniques.

En effet, des implants céramiques de matrice à base de polymère biodégradable naturel, la gélatine, ont été évalués pour l'administration du phosphate de CQ dans l'objectif d'une chimio-prophylaxie du paludisme. Les expérimentations réalisées chez l'animal ont montré une libération prolongée du principe actif dans le sang (Saparia *et al.* 2004).

L'utilisation de solutions micellaires (Casabianca *et al.* 2009), d'émulsions multiples (Vaziri *et al.* 1994) et de nanoémulsions lipidiques (Dierling *et al.* 2005, Shingh *et al.* 2008) pour l'administration orale de la CQ et de la PQ est également rapportée avec d'excellents résultats.

Des microsphères à base de gomme arabique (Nishi *et al.* 2004) ou d'éthyle cellulose (Patel *et al.* 2006) renfermant la PQ ou la CQ ont été aussi développées.

Les liposomes et les nanoparticules sont utilisés pour la vectorisation de certains principes actifs antipaludiques tels que l'halofantine, la CQ et l'ART et ses dérivés (Owais *et al.* 1995, Chimanuka *et al.* 2002, Gabriels *et al.* 2003, Mosqueira *et al.* 2004, Medha *et al.* 2008). Ces nanovecteurs sont principalement utilisés dans le but de réduire la toxicité de ces molécules actives ou d'améliorer leur biodisponibilité. Les évaluations réalisées avec ces systèmes ont montré que les liposomes étaient d'excellents véhicules pour certaines substances antipaludiques comme la CQ (Owais *et al.* 1995, Qiu *et al.* 2008), l'artésunate (Chimanuka *et al.* 2002, Gabriels *et al.* 2003), l'artéméther (Chimanuka *et al.* 2002) et l'ART (Isacchi *et al.* 2011a, 2011b). Ces différentes études ont mis en évidence le potentiel *in vitro* et *in vivo* (sur modèles animaux) des liposomes dans l'amélioration de la biodisponibilité des molécules associées et surtout dans le traitement des infections chloroquino-résistances. Les nanoparticules (nanosphères et nanocapsules) à base de polymères se sont également révélées intéressants pour la vectorisation des substances antipaludiques. en effet, l'association de la CQ (Agrawal *et al.* 2007), de l'halofantrine (Mosqueira *et al.* 2004) et de l'ART (Chen *et al.* 2009, Kakran *et al.* 2010a, 2010b) aux systèmes nanoparticulaires a donné d'excellents résultats d'efficacité antipaludique chez la souris. Le tropisme hépatosplénique de ces vecteurs a surtout été exploité pour le ciblage du foie avec la PQ qui à une action sur les formes hépatiques du *Plasmodium* (Green *et al.* 2004).

La plupart des molécules antipaludiques n'étant actives que sur les formes plasmodiales érythrocytaires, il est impératif que ces vecteurs colloïdaux administrés par voie parentérale restent en circulation dans le courant sanguin pour interagir avec les globules rouges infectés. De ce fait, l'administration de molécules antipaludiques avec des liposomes à résidence vasculaire prolongée (Isacchi *et al.* 2011a, 2011b) ou ciblés vers les cellules d'érythrocytes (Owais *et al.* 1995) a été considérée dans certaines études. L'augmentation de la rémanence vasculaire des liposomes via la décoration surfacique par des molécules de PEG ou la fixation des liposomes aux globules rouges via le greffage d'anticorps de reconnaissance (fragments Fab') ont donné montré une efficacité dans la réduction de la parasitémie (Isacchi *et al.* 2011b, Owais *et al.* 1995).

Les formulations de nanocapsules PEGylées à temps de circulation sanguine prolongé ont présenté également des profils d'efficacité supérieurs aux solutions organiques d'halofantrine dans le traitement du paludisme chez la souris sévèrement infectée par *Plasmodium berghei*, modèle animal idéal pour investiguer les molécules antipaludiques (Mosqueira *et al.* 2004).

Enfin, une étude réalisée par Medha *et al.* (2005) chez la souris infectée par *Plasmodium berghei* a montré que des nanoparticules lipidiques d'environ 60 nm renfermant de l'artéméthér offraient plusieurs avantages comparativement aux formes commerciales IM d'artéméthér disponibles. Ces avantages sont entre autres, une activité antipaludique plus importante et prolongée en durée (allant jusqu'à 20 jours) et des taux de survie plus élevés (Medha *et al.* 2005).

7. Notre étude : objectifs, stratégies et justifications

Notre étude s'inscrit dans cette dynamique d'optimisation de la thérapeutique anti-palustre à travers la vectorisation des molécules antipaludiques par des systèmes colloïdaux. Elle vise à développer à travers la formulation, une forme médicamenteuse innovante à base d'ART pour une prise en charge par voie intraveineuse du paludisme grave. Plus spécifiquement, il s'agit de proposer une formulation avec des quantités appréciables d'ART mises en solution et d'autre part d'assurer le maintien de concentrations efficaces (au-delà de la concentration minimale inhibitrice) de manière prolongée afin d'assurer l'élimination des parasites présents dans la circulation.

Le choix porté sur l'ART, molécule mère naturelle à partir de laquelle ses dérivés sont obtenus, peut se justifier à plusieurs titres. En effet, indépendamment des difficultés techniques d'obtention de formes injectables adéquates à base de dérivés d'ART pour la

prise en charge du paludisme, l'utilisation des dérivés hémi-synthétiques dans les pays africains est drastiquement réduite du fait de leur coût très élevé et du processus industriel d'hémi-synthèse onéreux, complexe et non transposable à ce jour en Afrique subsaharienne. En attendant la maîtrise de ces technologies d'hémi-synthèse, des progrès sensibles sont enregistrés quant à la culture de *l'Artemisia annua* qui s'adapte bien aux conditions écologiques locales (Ferreira *et al.* 2005, Endrias *et al.* 2006). Il en va de même des procédés d'extraction de l'ART couramment pratiqués et maîtrisés dans beaucoup de pays africains comme le Bénin, le Burkina Faso, le Sénégal (Endrias *et al.* 2006). Par ailleurs, l'ART reste la molécule de base pour l'obtention de ses analogues et *l'Artemisia annua* est la seule source d'ART à l'heure actuelle (Van Agtmael *et al.* 1999). La synthèse totale de la molécule est trop coûteuse pour être une voie d'accès industrielle (WHO 2001). Il conviendrait donc de promouvoir l'ART à travers des formulations galéniques innovantes comme solution au problème de prise en charge thérapeutique du paludisme grave, plutôt que de s'intéresser à ses analogues d'hémi-synthèse.

Plusieurs études ont déjà été initiées dans le but d'améliorer la mise en solution et d'augmenter la biodisponibilité de l'ART. Parmi ces études, il est possible de citer la réalisation de complexes d'inclusion de l'ART avec les cyclodextrines (CDs) hydrophiles (Wong and Yuen 2001, 2003), la co-atomisation de l'ART avec la maltodextrine (Sahoo *et al.* 2009) ou son association aux liposomes (Isacchi *et al.* 2011a, 2011b).

L'axe de formulation envisagée dans notre étude est d'adresser l'ART au plus près de son site d'action en l'association à des édifices supramoléculaires à base de CDs modifiées. Cette association de l'ART aux vecteurs colloïdaux à base de CDs amphiphiles est susceptible d'améliorer substantiellement sa biodisponibilité, son efficacité thérapeutique et sa tolérance.

En effet, les vecteurs de médicaments représentent une avancée importante dans l'administration de molécules actives par voie parentérale. L'association de certaines molécules actives d'intérêt aux nanovecteurs permet de résoudre le problème de solubilité et d'instabilité de ces molécules. Elle permet également de moduler le devenir *in vivo* de ces molécules à savoir la distribution dans l'organisme, grâce notamment à leur adressage à leurs cibles d'action (Couvreur 2001, Couvreur and Vauthier 2006, Vamvakas *et al.* 2011). Les vecteurs colloïdaux submicroniques développés ces dernières années ont montré un potentiel thérapeutique de grand intérêt : concentration du principe actif au niveau du site d'action, réduction de la toxicité, augmentation du temps de circulation des principes actifs labiles ou rapidement éliminés, amélioration de l'activité thérapeutique, augmentation de la

biodisponibilité de substances insolubles dans les fluides biologiques (Couvreur 2001, Couvreur and Vauthier 2006, Vamvakas *et al.* 2011).

Les CDs modifiées font partie de l'arsenal des matériaux actuellement explorés comme base d'élaboration de nanovecteurs pour la délivrance et le ciblage de principes actifs d'intérêt médical (Duchêne *et al.* 1999). Récemment, une technique efficace de transestérification des CDs, catalysée en une seule étape par une enzyme (thermolysine), en présence d'un ester de vinyle comme donneur de groupements alkyle a été développée et expérimentée avec succès pour l'obtention de nanoparticules (Pedersen *et al.* 2005, Choisnard *et al.* 2006, 2007). Les dérivés de CDs modifiées obtenus ont montré une bonne capacité d'auto-organisation sous forme d'agrégats supramoléculaires de formes et d'architectures variées. Ces nano-agrégats sont capables d'associer des quantités importantes de substances bioactives hydrophobes puis de les relarguer dans les conditions d'étude de libération *in vitro* (Gèze *et al.* 2009). Les nanostructures correspondantes ont été étudiées sur le plan physicochimique, morphologique et structural par des techniques complémentaires variées (Choisnard *et al.* 2006, 2007, 2011, Gèze *et al.* 2009).

La mise en œuvre de dérivés de CDs biotransestérifiées et de structures amphiphiles pegylées, permet de viser deux objectifs :

- i) d'une part d'améliorer la mise en solution de l'ART à travers son association aux vecteurs colloïdaux à base de CDs modifiées et
- ii) d'autre part d'améliorer sa biodisponibilité et son efficacité thérapeutique à travers l'hydrophilisation de la surface des nanovecteurs.

La décoration surfacique permettra de prolonger le temps de circulation sanguine des nanovecteurs tout en évitant une capture trop rapide par les organes du système des phagocytes mononuclées (SPM), suite à leur administration IV.

En effet, après administration par voie IV, la majorité des nanovecteurs (nanoparticules et liposomes) interagissent fortement avec les protéines plasmatiques. Cette interaction est favorisée par la très grande surface spécifique développée par les nanoparticules permettant la création d'interactions hydrophobes fortes avec les opsonines. Les vecteurs colloïdaux décorés d'opsonines en surface seront donc captés principalement par les cellules de Kupffer du foie et les macrophages de la zone marginale de la rate. Ces cellules possèdent en effet des récepteurs spécifiques reconnaissant ces opsonines (Moghimi *et al.* 2001). Cette distribution hépatosplénique est également favorisée par la structure histologique de l'endothélium vasculaire au niveau de ces tissus dont le caractère discontinu autorise le passage des colloïdes (Couvreur 2001, Barrat *et al.* 2003).

Les résultats de biodistribution avec les nanosphères de β -CD modifiées ont montré sans ambiguïté que ces nanoparticules se comportent comme des vecteurs à "tropisme hépatosplénique" [Gèze 2007]. Pour traiter certaines pathologies dont les cibles thérapeutiques se trouvent localisées dans le foie par exemple, il est préférable de favoriser une capture rapide de ces vecteurs par cet organe. A l'inverse quand les cibles thérapeutiques sont intra-vasculaires comme dans le cas de l'ART, il convient de modifier les propriétés physicochimiques des vecteurs afin de ralentir leur capture et de prolonger leur rémanence vasculaire. Ce qui permettra d'augmenter leur chance de se concentrer dans les organes ou tissus ciblés (Moghimi *et al.* 2001, 2003a, 2003b, Hoarau *et al.* 2004 Vonarbourg *et al.* 2006). Pour ce faire, il est nécessaire de conférer aux vecteurs une taille adéquate (50-200nm) et un caractère furtif. La taille de ces systèmes qui varie de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres selon la formulation est à l'origine de distributions tissulaires bien différenciées. Les particules de tailles plus importantes sont les plus rapidement éliminées de la circulation. La furtivité est généralement obtenue par recouvrement des vecteurs par des polymères hydrophiles et flexibles (dérivés de PEG, poloxamères, poloxamines ou polysaccharides). Cette modification surfacique empêche les protéines et en particulier les opsonines de s'adsorber à la surface des vecteurs (Moghimi *et al.* 2001, Lemarchand *et al.* 2005, Huynh *et al.* 2010).

Notre travail a consisté à étudier les potentialités d'un tel vecteur colloïdal à base de CDs bioestérifiées et de molécules amphiphiles de PEG, associé à l'ART. Il a été réalisé en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, à travers des études préliminaires dites de pré-formulation, nous avons développé puis validé les méthodes analytiques de dosage de l'ART, déterminé les caractéristiques physicochimiques et la stabilité de l'ART en solution, puis optimisé la synthèse et la caractérisation du matériau d'auto-assemblage.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons mis au point des formulations de suspensions colloïdales de nanosphères et de nanoréservoirs associant l'ART, en mettant en œuvre des CDs bio-estérifiées et des dérivés amphiphiles polyoxyéthylénés. Les caractéristiques physicochimiques, morphologiques et structurales des nanosystèmes nus et/ou chargés d'ART ainsi que la lyodisponibilité de l'ART prise en charge ont été également évaluées.

Dans une troisième partie, nous avons évalué les suspensions colloïdales sur le plan biologique à travers des études *in vitro* d'efficacité sur des cultures de *Plasmodium*, de cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes, de comportement vis-à-vis du SPM (macrophages et

protéines du complément). Enfin, la dernière partie de notre travail a consisté à évaluer *in vivo* la biodistribution des nanoparticules et les paramètres pharmacocinétiques de l'ART associée aux nanovecteurs après administration intraveineuse chez l'animal.

Ce document de thèse présente l'ensemble des travaux réalisés ainsi que les résultats obtenus. Il est subdivisé en trois parties.

La première partie est une revue bibliographique, présentée sous la forme d'un article de publication dans lequel nous développons le potentiel et l'intérêt des vecteurs colloïdaux à base de CDs amphiphiles dans l'administration de substances bioactives.

La deuxième partie est consacrée à la publication des résultats à travers deux articles : *La publication de résultats n°1* porte sur les aspects de formulation des nanosystèmes à base de CDs bioestérifiées PEGylés ou non, associant l'ART ainsi que les évaluations *in vitro* de libération du principe actif et d'activité anti-plasmodiale.

La publication de résultats n°2 est consacrée aux évaluations des suspensions colloïdales de nanosphères et de nanocapsules à base de CDs bioestérifiées formulées avec des amphiphiles PEGylés de longueurs de chaînes différentes. Dans cette étude, nous avons réalisé un screening de plusieurs formulations par des tests *in vitro* (propriétés hémolytique, consommation du complément sérique, capture par les macrophages). Les données *in vitro* ont été complétées par des essais *in vivo* de biodistribution comparative chez la souris après administration intraveineuse.

Dans la troisième partie, une discussion générale reprend les différents points traités dans ce travail. Nous décrivons en complément, un certain nombre de résultats non présentés dans la seconde partie permettant d'approfondir la discussion.

En fin de manuscrit, une conclusion générale permet de dresser un bilan des objectifs atteints et présenter quelques perspectives à ce travail de thèse.

Références

- Abdulla S., Sagara I., Borrmann S., D'Alessandro U., González R., *et al.*, Efficacy and safety of artemether-lumefantrine dispersible tablets compared with crushed commercial tablets in African infants and children with uncomplicated malaria: a randomised, single-blind, multicentre trial, *Lancet*. 372(9652) (2008) 1819-1827.
- Adebayo J.O., Krettli A.U., Potential antimalarials from Nigerian plants: a review, *J. Ethnopharmacol.* 133(2) (2011) 289-302.
- Achan J., Tibenderana J.K., Kyabayinze D., Wabwire-Mangen F., Kanya M.R., *et al.*, Effectiveness of quinine versus artemether-lumefantrine for treating uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children: randomised trial, *BMJ*. 21(339) (2009) b2763.
- Agrawal P., Gupta U., Jain N.K., Glycoconjugated peptide dendrimers-based nanoparticulate system for the delivery of chloroquine phosphate, *Biomaterials* 28(22) (2007) 3349-3359.
- Barratt G., Colloidal drug carriers: achievements and perspectives, *Cellular and Molecular Life Sciences* 60 (2003) 21-37.
- Barennes H., Balima-Koussoubé T., Nagot N., Charpentier J.C., Pussard E., Safety and efficacy of rectal compared with intramuscular quinine for the early treatment of moderately severe malaria in children: randomised clinical trial, *BMJ*. 6;332(7549) (2006) 1055-1059.
- Bellot F., Coslédan F., Vendier L., Brocard J., Meunier B., Robert A., Trioxaferroquines as new hybrid antimalarial drugs, *Journal of medicinal Chemistry* 53(10) (2010) 4103-4109.
- Benoit-Vical F., Lelièvre J., Berry A., Deymier C., Dechy-Cabaret O., *et al.*, Trioxaquinones are new antimalarial agents active on all erythrocytic forms, including gametocytes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(4) (2007) 1463-1472.
- Bero J., Quetin-Leclercq J., Natural products published in 2009 from plants traditionally used to treat malaria, *Planta Med.* 77(6) (2011) 631-640.
- Bousejra-El Garah F., Claparols C., Benoit-Vical F., Meunier B., Robert A., The antimalarial trioxaquine DU1301 alkylates heme in malaria-infected mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(8) (2008) 2966-2969.
- Bousema T., Drakeley C., Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination, *Clin. Microbiol. Rev.* 24(2) (2011) 377-410.
- Bunyarataphan S., Leartsakulpanich U., Taweechai S., Tarnchompoo B., Kamchonwongpaisan S., Yuthavong Y., Evaluation of the activities of pyrimethamine analogs against *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase using in vitro enzyme inhibition and bacterial complementation assays, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(11) (2006) 3631-3637.
- Burgoine K.L., Bancone G., Nosten F., The reality of using primaquine, *Malar J.* 27(9) (2010) 376.
- Bzik D.J., Li W.B., Horii T., Inselburg J., Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(23) (1987) 8360-8364.
- Casabianca L.B., Kallgren J.B., Natarajan J.K., Alumasa J.N., Roepe P.D., Wolf C., de Dios A.C., Antimalarial drugs and heme in detergent micelles: An NMR study, *J. Inorg. Biochem.* 103(5) (2009) 745-748.
- Chen Y., Lin X., Park H., Greever R., Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems, *Nanomedicine*. 5(3) (2009) 316-322.
- Choubey V., Maity P., Guha M., Kumar S., Srivastava K., Puri S.K., Bandyopadhyay U., Inhibition of *Plasmodium falciparum* choline kinase by hexadecyltrimethylammonium bromide: a possible antimalarial mechanism, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(2) (2007) 696-706.
- Chimanuka B., Gabriels M., Dtaevernier M-R., Plaizier-Vercammen J.A., Preparation of β -artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescence parasitemia in *Plasmodium chabaudi* malaria-infected mice, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 28 (2002) 13-22.

- Choisnard L., Gèze A., Putaux J.L., Wong Y.S., Wouessidjewe D., Nanoparticles of β -cyclodextrin esters obtained by self-assembling of biotransesterified Cyclodextrins, *Biomacromol.* 7 (2006) 515-520.
- Choisnard L., Gèze A., Yaméogo B.G.J., Putaux J.L., Wouessidjewe D., Miscellaneous nanoaggregates made of β -Cyclodextrins esters synthesised by an enzymatic pathway, *Int. J. Pharm.* 344 (2007) 26-32.
- Choisnard L., Gèze A., Vanharverbeke C., Yaméogo J.B.G., Putaux J-L, Brasme B., Julien L., Boulanger S., Elfakir C., Wouessidjewe D., Physicochemical characterization of α -, β - and γ -cyclodextrins bioesterified with decanoate chains used as building blocks of colloidal nanoparticles, *Biomacromol.* 12(8) (2011) 3031-3038.
- Christen P., Veuthey J.L., New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives, *Current Med. Chem.* 8 (2001) 1827-1839.
- Cohen J., Bennis S., Vekemans J., Leach A., Le candidat vaccin antipaludique RTS,S/AS est entré en essais cliniques de phase III, *Ann. Pharm. Fr.* 68 (2010) 370-379.
- Costantino H.R., Illum L., Brandt G., Johnson P.H., Quay S.C., Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects, *Int. J. Pharm.* 337(1-2) (2007) 1-24.
- Couvreur P., La vectorisation des médicaments ou comment moduler la distribution tissulaire et cellulaire de molécules biologiquement actives, *Ann. Pharm. Fr.* 59 (2001) 232-238.
- Couvreur P., Vauthier C., Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease, *Pharm. res.* 27(7) (2006) 1417-1450.
- Crespo-Ortiz M.P., Wei M.Q., Antitumoral activity of artemisinin and its derivatives: from a well-know antimalarial agents to a potential anticancer drug, *J. Biomed. Biotechnol.* (2012) doi: 10.1155/2012/247597.
- Dechy-Cabaret O., Benoit-Vical F., Loup C., Robert A., Gornitzka H., Bonhoure A., Vial H., Magnaval J.F., Séguéla J.P., Meunier B., Synthesis and antimalarial activity of trioxaquine derivatives, *Chemistry.* 2;10(7) A (2004) 1625-1636.
- Dierling A.M, Cui Z., Targeting primaquine into liver using chylomicron emulsions for potential vivax malaria therapy, *Int. J. Pharm.* 303(1-2) (2005) 148-152.
- Duchêne D., Ponchel G. Wouessidjewe D., Cyclodextrins in targeting, Application to nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 29-40.
- Endrias A., Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'Hibiscus sabdarifa L. et à l'Artemisia annua, Thèse Institut National de Polytechnique de Toulouse (2006) 185p.
- Fathy F.M., Anthelmintic effect of artesunate in experimental heterophyid infection, *J. Egypt Soc. Parasitol.* 41(2) (2011) 469-483.
- Ferreira J.F.S., Laughlin J.C, Delabays N., Magalhaes P.M., Cultivation and genetics of *Artemisia annua* for increased production of the anti-malarial artemisinin, *Plant Genet. Resour.* 3 (2005) 206-229.
- Gabriels M., Plaizier-Vercammen J., Physical and chemical evaluation of liposomes, containing artesunate, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 31 (2003) 655-667.
- Gansané A., Sanon S., Ouattara L.P., Traoré A., Hutter S., Olivier E., Azas N., Traoré S., Guissou I.P., Sirima S.B., Nebié I., Antiplasmodial activity and toxicity of crude extracts from alternatives parts of plants widely used for the treatment of malaria in Burkina Faso: contribution for their preservation, *Parasitol. Res.* 106 (2010) 335-340.
- Gèze A., Tieu Chau L., Choisnard L., Mathieu J.P., Marti-Battle D., Riou L., Putaux J-L., Wouessidjewe D., Biodistribution of intravenously administrated amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres, *Int. J. Pharm.* 344 (1-2) (2007) 135-142.
- Gèze A., Choisnard L., Putaux J-L., Wouessidjewe D., Colloidal systems made of biotransesterified cyclodextrins grafted with C10 alkyl chains, *Mater. Science Eng. C* 29 (2009) 458-462.
- Glynn P., Salama A., Chaudhry A., Swirsky D., Lightstone L., Quinine-induced immune thrombocytopenic purpura followed by hemolytic uremic syndrome, *Am J. Kidney Dis.* 33(1) (1999) 133-137.

- Gordeuk V.R., Loyevsky M., Antimalarial effect of iron chelators, *Adv. Exp. Med. Biol.* 509 (2002) 251-272.
- Gottschall J.L., Elliot W., Lianos E., McFarland J.G., Wolfmeyer K., Aster R.H., Quinine-induced immune thrombocytopenia associated with hemolytic uremic syndrome: a new clinical entity, *Blood*. 77(2) (1991) 306-310.
- Graff C.L., Pollack G.M., Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery, *J. Pharm. Sci.* 94(6) (2005) 1187-1195.
- Green M.D., D'Souza M.J., Holbrook J.M., Wirtz R.A., *In vitro* and *in vivo* evaluation of albumin-encapsulated primaquine diphosphate prepared by nebulization into heated oil, *J. Microencapsul.* 21(4) (2004) 433-444.
- Hatz C., Soto J., Nothdurft H.D., Zoller T., Weitzel T., *et al*, Treatment of acute uncomplicated falciparum malaria with artemether-lumefantrine in nonimmune populations: a safety, efficacy, and pharmacokinetic study, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78(2) (2008) 241-247.
- Heard C.M., Monk B.V., Modley A.J., Binding of primaquine to epidermal membranes and keratin, *Int. J. Pharm.* 12;257(1-2) (2003) 237-244.
- Henry M., Alibert S., Orlandi-Pradines E., Bogreau H., Fusai T., Rogier C., Barbe J., Pradines B., Chloroquine resistance reversal agents as promising antimalarial drugs, *Curr. Drug Targets* 7(8) (2006) 935-948.
- Henry M., Alibert S., Rogier C., Barbe J., Pradines B., Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria, *Curr. Top. Med. Chem.* 8(7) (2008) 563-578.
- Hilou A., Nacoulma O.G., Guiguemde T.R., *In vivo* antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice., *J. Ethnopharmacol.* 103(2) (2006) 236-240.
- Hoarau D., Delmas P., David S., Roux E., Leroux J., Novel long-circulating lipid nanocapsules, *Pharm. Res.* 21(10) (2004) 1783-1789.
- Huynh N.T., Roger E., Lautram N., Benoit J.P., Passirani C., The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: passive versus active targeting, *Nanomedicine* 2010, 5(9): 1415-1433.
- Impact malaria, Biologie du plasmodium, E-module d'enseignement sur le paludisme, disponible en ligne sur le site URL : <http://www.impact-malaria.com/iml/cx/fr/layout.jsp?cnt=A01B208A-FBA9-41E6-A37A-6DA51BE9D196> (date de consultation 20 décembre 2011).
- Isacchi B., Arrigucci S., la Marca G., Bergonzi M.C., Vannucchi M.G., Novelli A., Bilia A.R., Conventional and long-circulating liposomes of artemisinin: preparation, characterization, and pharmacokinetic profile in mice., *J. Liposome Res.* 21(3) (2011a) 237-244.
- Isacchi B., Bergonzi M.C., Grazioso M., Righeschi C., Pietretti A., Severini C., Bilia A.R., Artemisinin and artemisinin plus curcumin liposomal formulations: Enhanced antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei*-infected mice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2011b), In press, corrected proof, available online 28 November 2011.
- Jeans C.W., Heard C.M., A therapeutic dose of primaquine can be delivered across excised human skin from simple transdermal patches, *Int. J. Pharm.* 189(1) (1999) 1-6.
- Kakran M., Sahoo N.G., Li L., Judeh Z., Dissolution of artemisinin/polymer composite nanoparticles fabricated by evaporative precipitation of nanosuspension, *J. Pharm. Pharmacol.* 62(4) (2010a) 413-421.
- Kakran M., Sahoo N.G., Li L., Judeh Z., Panda P., Artemisinin-Polyvinylpyrrolidone Composites Prepared by Evaporative Precipitation of Nanosuspension for Dissolution Enhancement, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 21 (2010b).
- Keiser J., Utzinger J., Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20(6) (2007) 605-612.
- Kelly J.X., Smilkstein M.J., Brun R., Wittlin S., Cooper R.A., Lane K.D., Janowsky A., Johnson R.A., Dodean R.A., Winter R., Hinrichs D.J., Riscoe M.K., Discovery of dual function acridones as a new antimalarial chemotype, *Nature* 459(7244) (2009) 270-273.

- Kirby C. and Gregoriadis G., "Liposomes", The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, Ed. E Mathiowitz (1999).
- Klayman D.L., Ager A.L., Fleckenstein L., Lin A.J., Transdermal artelinic acid: an effective treatment for *Plasmodium berghei*-infected mice, *Am. J. Trop. Med.* 45 (1991) 602-607.
- Kokwaro G., Mwai L., Nzila A., Artemether/lumefantrine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria, *Expert Opin. Pharmacother.* 8(1) (2007) 75-94.
- Lai H., Sasaki T., Singh N.P., Targeted treatment of cancer with artemisinin and artemisinin-tagged iron-carrying compounds, *Experts Opin. Ther. Targets* 9(5) (2005) 995-1007.
- Le Bras J., Durand R., The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17(2) (2003) 147-153.
- Le Bras J., Musset L., Clain J., Antimalarial drug resistance, *Med. Mal. Infect.* 36(8) (2006) 401-405.
- Lebrun-Vignes B., Les antimalariques : pharmacologie, pharmacocinétique et toxicité chez l'adulte, *Med. Mal. Infect.* 29 Suppl 2 (1999) 229-48.
- Lemarchand, C., Gref, R., Lesieur S., Hommel H., Vacher B., Besheer A., Maeder K., Couvreur P., Physico-chemical characterization of polysaccharide-coated nanoparticles, *J. Control Release* 2005, 108: 97-111.
- Lin A.J., Ager A.L., Klayman D.L., Antimalarial activity of dihydroartemisinin derivatives by transdermal application, *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* 50(6) (1994) 777-783.
- Lu F., Lim C.S., Nam D.H., Kim K., Lin K., *et al*, Mutations in the antifolate-resistance-associated genes dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic countries, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83(3) (2010) 474-479.
- Martindal: The complete drug reference 37th revised edition, Antimalarials, Pharm. Press London (2011) 444-463.
- Mayorga P., Deharo E., Landau I., Couarraze G., Preliminary evaluation of primaquine activity on rodent malaria model after transdermal administration, *Parasite.* 4(1) (1997) 87-90.
- Mayorga P., Miltgen F., Coquelin F., Couarraze G., Rodent malaria prophylaxis by transdermal delivery of primaquine, *Int. J. Parasitol.* 28(8) (1998) 1283-1285.
- Medha J., Sulabha P., Shobhona S., Vandana P., Design and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject, *Int. J. Pharm.* 364 (2008) 119-126.
- Ministère Santé-Burkina Faso, Synthèse de l'annuaire statistique santé, MS-SG-DGISS (2009) 42p.
- Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C., Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory and practice, *Pharmacol. Rev.* 53 (2001) 283-318.
- Moghimi S.M., Szebeni J., Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties, *Progress Lipid Res.* 42 (2003a) 463-478.
- Moghimi S. M., Pavey K., Hunter A.C., Real-time evidence of surface modification at polystyrene lattices by poloxamine 908 in the presence of serum: *in vivo* conversion of macrophage-prone nanoparticles to stealth entities by poloxamine 908, *FEBS Letters* 547 (2003b) 177-182.
- Mosqueira V.C.F., Loiseau P.M., Borjes C., Legrand P., Devissaguet J-P., Barrat G., Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsules formulations of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 1222-1228.
- Musabayane C.T., Munjeri O., Matavire T.P., Transdermal delivery of chloroquine by amidated pectin hydrogel matrix patch in the rat, *Ren. Fail.* 25(4) (2003) 525-534.
- Nakase I, Lai H., Singh N.P., Sasaki T., Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation, *Int. J. Pharm.* 354 (2008) 28-33.
- Newton P.N., Angus B.J., Chierakul W., Dondorp A., Ruangveerayuth R, *et al.*, Randomized comparison of artesunate and quinine in the treatment of severe falciparum malaria, *Clin. Infect. Dis.* 37(1) (2003) 7-16.

- Nishi K.K., Jayakrishnan A., Preparation and in vitro evaluation of primaquine-conjugated gum arabic microspheres, *Biomacromol.* 5(4) (2004) 1489-1495.
- Nosten F., White N.J., Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(6 Suppl) (2007) 181-192.
- Owais M., Varshney G.C., Choudhury A., Chandra S., Gupta C.M., Chloroquine encapsulated in malaria-infected erythrocytes-specific antibody-bearing liposomes effectively controls chloroquine-resistant *Plasmodium berghei* infections in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 180-184.
- Patel V.A., Murthy R.S.R., Patel H.V., Formulation and in vitro characterization of ethyl cellulose microspheres containing chloroquine phosphate, *J. Indian Pharm.* 5(51) (2006) 82-86.
- Pedersen N.R., Kristensen J.B., Bauw G., Ravoo J., Darcy R., Larsen K.L., Pedersen L.H., Thermolysin catalyzes the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO, *Tetrahedron: Asymmetry* 16(3) (2005) 615-622.
- Pradines B., Millet J., Henry M., Iron chelation in antimalarial therapy, *Med. Trop.* 63(2) (2003) 119-130.
- Pussard E., Straczek C., Kaboré I., Bicaba A., Balima-Koussoube T., Bouree P., Barennes H., Dose-dependent resorption of quinine after intrarectal administration to children with moderate *Plasmodium falciparum* malaria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(11) (2004) 4422-4426.
- Qiu L., Jing N., Jin Y., Preparation and in vitro evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH-gradient method, *Int. J. Pharm.* 361 (2008) 56-63.
- Rodriguez J., Santos-Magalhaes N., Coelho L., Couvreur P., Ponchel G., Gref R., Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *J. Control. Release* 92 (2003) 103-112.
- Sahoo N.G., Abbas A., Judeh Z., Li C.M., Yuen K.H., Solubility enhancement of poorly water-soluble antimalarial drug: experimental design and use of a modified multifluid nozzle pilot spray drier, *J. Pharm. Sci.* 98(1) (2009) 281-296.
- Saparia B., Solanki A., Murthy R.S.R., Sustained release implants of chloroquine phosphate for possible use in chemoprophylaxis of malaria, *Indian J. Exp. Biol.* 39(9) (2001) 902-5.
- Sinclair D., Zani B., Donegan S., Olliaro P., Garner P., Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria, *Cochrane Database Syst. Rev.* 8(3) (2009) CD007483.
- Singh K.K., Vingkar S.K., Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine, *Int. J. Pharm.* 22;347(1-2) (2008) 136-143.
- Sirima S.B., Tiono A.B., Ouédraogo A., Diarra A., Ouédraogo A.L., *et al.* Safety and Immunogenicity of the Malaria Vaccine Candidate MSP3 Long Synthetic Peptide in 12-24 Months-Old Burkinabe Children, *PLoS One* 4(10) (2009): e7549.
- Sirima S.B., Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 1062-1063.
- Tarnchompoo B., Sirichaiwat C., Phupong W., Intaraudom C., Sirawaraporn W., *et al.* Development of 2,4-diaminopyrimidines as antimalarials based on inhibition of the S108N and C59R+S108N mutants of dihydrofolate reductase from pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum*, *J. Med. Chem.* 14;45(6) (2002) 1244-1252.
- Taylor W.R., White N.J., Antimalarial drug toxicity: a review, *Drug Saf.* 27(1) (2004) 25-61.
- Taylor W.R., Cañon V., White N.J., Pulmonary manifestations of malaria: recognition and management, *Treat Respir. Med.* 5(6) (2006) 419-28.
- Touitou E., Wagnine J.H., Godin B., Golenser J., Treatment of malaria in a mouse model by intranasal drug administration, *Int. J. Parasitol.* 36(14) (2006) 1493-1498.
- Traoré M., Diallo A., Nikièma J.B., Tinto H., Dakuyo Z.P., Ouédraogo J.B., Guissou I.P., Guiguemdé T.R., *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of 'saye', an herbal remedy used in Burkina Faso traditional medicine., *Phytother. Res.* 22(4) (2008) 550-551.
- Vamvakas S., Martinalbo J., Pita R., Isaac M., On the edge of new technologies (advanced therapies, nanomedicines), *Drug Discovery Today: Technologies* 2011.

- Van Agtmael M.E., Eggelte T.A., Van Boxtel C.J., Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication, *TiPS* 20 (1999) 199-205.
- Van Schalkwyk D.A., Egan T.J., Quinoline-resistance reversing agents for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Drug Resist. Updat.* 9(4-5) (2006) 211-226.
- Vaziri A., Warburton B., Slow release of chloroquine phosphate from multiple taste-masked W/O/W multiple emulsions, *J. Microencapsul.* 11(6) (1994) 641-648.
- Vauthier C., Schmidt C., Couvreur P., Measurement of the density of polymeric nanoparticulate drug carriers by isopycnic centrifugation, *J. Nanopart. Res.* 1 (1999) 411-418.
- Vonarbourg A., Passirani C., Saulnier P., Benoit J.P., Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials* 27(24) (2006) 4356-4373.
- Weinberg E.D., Moon J., Malaria and iron: history and review, *Drug Metab. Rev.* 41(4) (2009) 644-662.
- Wong J.W., Yuen K.H., Improved oral bioavailability of artemisinin through inclusion complexation β - and γ -cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* 227 (2001) 177-185.
- Wong J.W., Yuen K.H., Inclusion complexation of artemisinin with α -, β - and γ -cyclodextrins, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29 (2003) 1035-1044.
- World Health Organization (WHO), management of severe malaria: A practical handbook, 2nd ed., 2000, 84p.
- World Health Organization (WHO), The use of antimalarial drugs: Report of a WHO Informal consultation 13-17 november 2001 (WHO/CS/RBM/2001.33).
- World Health Organization (WHO), évaluation et surveillance de l'efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à *plasmodium falciparum* non compliqué, WHO/HTM/RBM/2003.50 (2004).
- World Health Organization (WHO), Malaria vaccine technology roadmap (2006), available online from URL: http://www.malariavaccineroadmap.net/pdfs/Malaria_Vaccine_TRM_Final.pdf.
- World Health Organization (WHO), utilisation des suppositoires à base d'artémisinine dans la prise en charge du paludisme grave, rapport d'une consultation informelle de l'OMS du 27-28 mars 2006, WHO/HTM/MAL/2006.1118 (2007) 27p.
- World Health Organization (WHO), World malaria report 2011, WHO Global Malaria Program (2011) 246p.
- World Health Organization (WHO), Directives pour le traitement du paludisme, 2^{ème} éd. (2011b) 219p.
- Zhou L.L., Hou H.X., Li R., A study on the percutaneous penetration of artesunate from various reservoir vehicles, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 27(9) (2002) 662-665.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les systèmes nano-assemblés à base de cyclodextrines modifiées dans la vectorisation des substances bioactives

Les CD amphiphiles sont à la base de nombreux systèmes supramoléculaires colloïdaux. Les dérivés modifiés par greffage de chaînes alkyle sur la structure des CDs mères peuvent sous certaines conditions, s'auto-organiser et former des nano-agrégats submicroniques de type matriciel (nanosphères) ou réservoir (nanocapsules). Ces structures supramoléculaires à base de CD modifiées ont montré une bonne capacité à associer certaines substances bioactives faiblement solubles en milieu aqueux, avec des taux de recouvrement importants. La cinétique de libération des molécules actives à partir des nanostructures est fortement dépendante des caractéristiques physicochimiques du principe actif et de la nature du dérivé de CD amphiphile mis en œuvre.

Le potentiel des suspensions colloïdales à base de CDs amphiphiles non-ioniques dans la vectorisation des substances bioactives est présenté sous la forme d'un article de revue bibliographique.

Dans cet article qui constitue une introduction justifiée du sujet sur lequel portera notre travail expérimental, nous développons la synthèse et la caractérisation du matériau, ainsi que la préparation et les caractérisations morphologique, structurale et biologique des systèmes supramoléculaires obtenus à partir de ces entités moléculaires. Nous abordons également certaines applications pharmaceutiques de ces suspensions colloïdales notamment, dans la délivrance et la vectorisation des substances bioactives.

***Article de revue bibliographique en préparation pour soumission à
Journal of Nanobiotechnology.***

Progress in developing amphiphilic cyclodextrin-based nano-devices for drug delivery

Josias B.G. Yaméogo^{1,3}, Annabelle Gèze¹, Luc Choisnard¹, Jean-Luc Putaux², Rasmané Semdé³, Denis Wouessidjewe¹

¹ DPM, UMR CNRS 5063, ICMG FR 2607, Faculty of Pharmacy, University of Grenoble, France

² CERMAV, UPR CNRS 5301, ICMG FR 2607, Grenoble, France

³ UFR/SDS, University of Ouagadougou, Burkina Faso

Correspondence to: Annabelle Gèze, Tel.: +33 476635301, Fax: +33476635322, E-mail address: annabelle.geze@ujf-grenoble.fr

Abstract

Nowadays, colloidal drug carriers represent an alternative to solve some of the delivery problems related to physicochemical and biomimetic properties of some drugs molecules that are either poorly soluble in aqueous media, either poorly absorbed or rapidly degraded and metabolized. During the past two decades, colloidal drug carriers have proved to be used to improve the therapeutic index of drug and thus increasing their efficacy and/or reducing their toxicity. However, the major challenge in the development of these drug carriers remains the search for materials able to self-organize in stable nanoscale systems. Amphiphilic α -, β - and γ - cyclodextrins (CDs), particularly thus grafted on the secondary or primary sides with different aliphatic chains, have been investigated as drug delivery vehicles due to their ability to self-assemble and form stable various supramolecular devices as matrix nanoparticles, micellar aggregates, multi-lamellar nano-aggregates or reservoir nanostructures. These self-assembled CD-based nano-devices show some advantages in terms of stability, good ability to associate lipophilic drugs and good *in vivo* tolerance. This review focuses on the potential of the nano-structured particles obtained from non-ionic amphiphilic CDs in drug delivery and drug targeting. We discuss the synthesis and characterization of the building blocks, the preparation and characterization of colloidal particles made from these materials. We also considered some pharmaceutical applications and identify opportunities for an optimum use of this CD-nanotechnology approach in addressing worldwide priority health problems.

Keywords: amphiphilic cyclodextrins, synthesis, characterization, nanoparticles, drug delivery, bioevaluation.

Contents

1. Introduction.....
2. A brief review on amphiphilic cyclodextrin derivatives
3. Synthesis and characterization of amphiphilic cyclodextrins
3.1. Chemical synthesis pathway
3.2. Enzymatically-assisted synthesis
3.3. Physicochemical characterization of amphiphilic cyclodextrins
4. Supramolecular assemblies based on amphiphilic cyclodextrins
4.1. Types of colloidal systems.....
4.2. Self-assembling properties of amphiphilic CDs into nanoparticles.....
5. Potential applications of amphiphilic cyclodextrin colloidal carriers in drug delivery
5.1. Drugs association and release
5.2. Bioevaluation of amphiphilic CD colloidal carriers
6. Conclusion
References.....

1. Introduction

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides consisting of glucopyranose units linked by α -(1,4) bonds [Leemhuis 2010]. CDs are of three types (α , β and γ) depending on the number of glucopyranose units in the molecule: 6, 7 or 8, respectively. The molecule has a three-dimensional truncated cone structure with a closest and a largest side, respectively called primary face and secondary face. Each glucopyranose unit of the molecule contains three hydroxyl groups in positions 2, 3 and 6. The hydroxyl at position 6 is placed on the primary side and the hydroxyl in positions 2 and 3 on the secondary face. This arrangement results in a polar, hydrophilic external surface and relatively apolar, hydrophobic nano-cavity making CD molecules soluble in aqueous medium with possibility to accept lipophilic guest molecules in their cavity via non-covalent bonds [Davis 2004; Rajesweri 2005; Shimpi 2005].

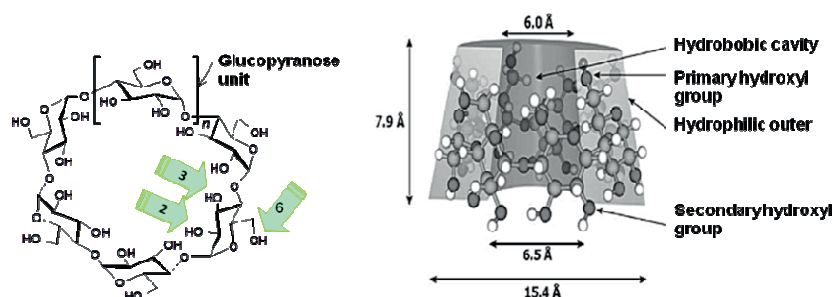


Figure 1. Chemical structure and conformation of native β -CD.

The physicochemical properties of CDs and various chemical potential modifications are of great interest for applications in various domains. The capability of forming inclusion complexes with hydrophobic guest molecules is particularly of interest for administration of bioactive molecules with poor water solubility. This molecular “encapsulation” confers different physicochemical properties to the guest molecule, including improved stability, aqueous solubility, bioavailability, and sometimes reduced toxicity [Davis 2004; Rajesweri 2005; Shimpi 2005].

Natural CDs are biocompatible, resistant to degradation by human enzymes and excreted as they are after parenteral administration. However, they are likely to be degraded by microbial enzymes in the colon after oral administration. A hemolytic character is well known but appears only in high concentrations [Davis 2004].

The β -CD, besides being commercially available at low cost, has a cavity size suitable for many bioactive substances. However, its low solubility in water, hemolytic character as well as nephrotoxicity, limit its use by parenteral route [Frank 1976]. A breakdown of hydrogen bonds via internal chemical changes increases its solubility in water. Therefore, hydrophilic

chemically modified derivatives have been synthesized to extend the physicochemical properties of native CDs. The water-soluble derivatives obtained are excipients of pharmaceutical interest because they can reduce the nephrotoxicity and hemolytic activity of native CDs. This increase in the solubility of the CDs is generated by two mechanisms: the breakdown of hydrogen bonds existing between the hydroxyl groups in positions 2 and 3 and the prevention of crystallization due to the formation of statistically substituted molecules leading to amorphous products [Davis 2004].

The natives CDs (α , β and γ) and water-soluble derivatives, while interesting in the formation of inclusion complexes with hydrophobic drugs, have a low affinity for biological membranes due to their hydrophilic character [Shimpi 2005]. Also, they are not able to self-organize in supramolecular aggregates. To give them this property, it is necessary to modify the molecule by grafting on their basic skeleton, chemical groups able to alter their solubility in water and simultaneously generate a structure with two parts, a hydrophilic and a lipophilic part. Obtaining such amphiphilic CDs involves the grafting of a lipophilic entity on the primary and/or secondary side of glucopyranose units. Therefore, these amphiphilic CDs appear as interesting new material for the preparation of various supramolecular devices allowing drug delivery and passive drug targeting.

In this review we give an overview of the benefits of non-ionic amphiphilic CDs. We particularly develop the characteristics of CD derivatives substituted with alkyl chains and the colloidal systems obtained from these molecular entities: their preparation, their physicochemical, their morphological aspects, their ultrastructure, their biological properties and some applications in drug delivery and/or targeting.

2. A brief review on amphiphilic cyclodextrin derivatives

Amphiphilic CDs offer a new perspective in the use of oligosaccharides in medicine. During the past two decades, numerous amphiphilic CDs have been obtained by grafting different substituents on the primary, secondary, or both faces of natural CDs in order to obtain derivatives able to form supramolecular devices considered as potential drug carriers.

The entities grafted are lipid derivatives (cholesterol or phospholipids), linear hydrocarbon chains, or macromolecules. However, most of the work described in the literature concerns the amphiphilic CDs substituted by alkyl chains. In those cases, the grafting links involved are particularly those of ester, ether, sulphanyl-deoxy, amine or thiol amide types [Duchêne 1999]. The primary alcohol function is more reactive compared with secondary alcohol

functions because of its high acidity and low steric hindrance of the carbon in position 6 [Perez-Victoria 2006]. The synthesis process will be decisive for the localization of substituent and the degree of substitution. The substitution on the primary side of the CD is easy, but it is essential to control the proportions of reagents and operating parameters to prevent reaction on the secondary rim. The selective substitution on the secondary side, however, is more delicate [Zhang 1991]. Different types of water-insoluble non-ionic amphiphilic CDs poly-substituted by alkyl groups were synthesized and described in the literature. Mentions may be made among others:

- *Medusa-like* amphiphilic CDs, per-substituted on the primary face by alkylsulfinyl groups with different chain lengths [Kawabata 1986].
- *Bouquet-shaped* amphiphilic CDs as per-(2,6-di-O-alkyl)-CDs, obtained by grafting 14 polymethylene chains on 3-monomethylated β -CD, leading to an equal number of chains on the primary (position 6) and secondary (position 2) sides [Wenz 1991; Canceill 1992].
- Per-substituted CDs on the secondary hydroxyl groups by alkyl chains namely *skirt-shaped* amphiphilic CDs, described by Zhang *et al* [Zhang 1991]. The first derivative of this group, the per-2,3-di-O-alkyl- β -CD is an over-acylated product with 21 chains. About ten years later, the conditions for grafting only 14 hexanoyl chains on the secondary side of β -CD have been developed and described [Lesieur 2000]. The *skirt-shaped* derivatives exhibit real surfactant characteristics [Tchoreloff 1995] and are susceptible to being biodegradable due to the ester bond making them particularly interesting.
- Second generation of *skirt-shaped* amphiphilic CDs preferentially acylated on the secondary hydroxyl group in position 2 obtained by biotransesterification of CD vinyl fatty ester. These bioesterified derivatives are statistical mixture constituted by parent CD with variable degree of substitution, ranging for 2 to 9 alkyl chains [Choisnard 2006; 2007].

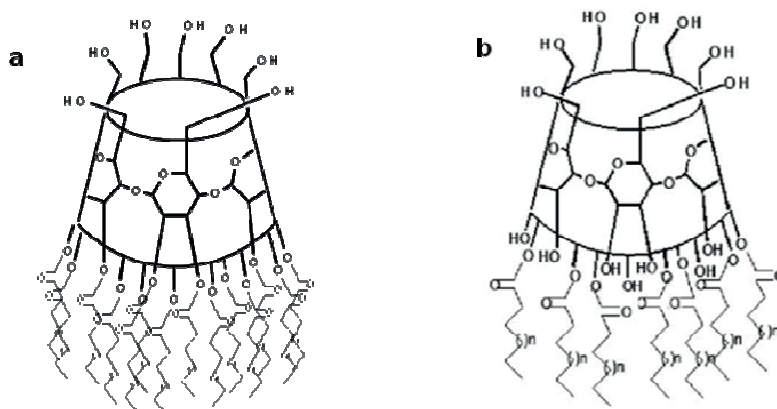


Figure 2. Schemes of amphiphilic β -cyclodextrins acylated on secondary face: first generation (a) and second generation (b) of *skirt-shaped* CD.

Other amphiphilic CD derivatives more or less soluble in water have also been synthesized by modifying one of the faces of amphiphilic CD molecule by hydrophilic groups and may be mentioned:

- Non-ionic amphiphilic CDs including derivatives substituted with ethylene glycols [Falvey 2005] and those substituted with glycosyl (glucosyl, mannosyl or fucosyl) [Mazzaglia 2006; McNicholas 2007] or galactosyl groups [Salameh 2005; Mazzaglia 2006]. In the cases of PEGylated derivatives, oligoethylene glycol, glycosylthiocarbamoyl-oligo-(ethylene glycol) or galactosylthio-oligo-(ethylene glycol) units were grafted on the secondary-hydroxyl side of the parent CD and hydrophobic group (alkylthio chains) on the primary-hydroxyl side. The non-PEGylated galactosylated derivatives combine galactopyranosylamino groups in the primary side of CD and aliphatic fatty ester chains on the secondary face [Salameh 2005]. Another category of amphiphilic β -CD derivatives, per-substituted on the secondary face by fatty ester chains (C_6 or C_{14}) and a residue of β -CD on the primary side, has been described [Defaye 2008].
- Cationic amphiphilic CDs comprising those in which amine group (pyridylamine, alkylimidazoles, methoxyethylamine or primary amine) were substituted in position 6 and oligo(ethylene glycol) chain substituted in position 2 of native CDs [Donohue 2002] and polyaminothio-urea amphiphilic derivatives [Diaz-Moscoso 2008]. Both possible orientations of the polycationic and hydrophilic domains on to CD molecule are possible and lead to *skirt-shaped* and *medusa-shaped* polycationic amphiphilic CDs [Ortiz-Mellet 2010]. The polycationic derivatives are especially interesting in genes delivery [Diaz-Moscoso 2008; Cryan 2004a; 2004b; Ortiz-Mellet 2010].
- Anionic amphiphilic CDs includes those synthesized with carboxyl group on the secondary side [Kraus 2001], polysulfated derivatives [Dubes 2003] and fluorinated derivatives. Fluorinated derivatives described are: per-substituted products with 7 fluorinated groups on the primary face [Kiadur 1999], derivatives with 14 groups of C_7F_{15} grafted on the secondary face [Skiba 2003], 6-per-trifluorométhylthio- β -CD derivatives [Granger 2000] and mono-, di- or tetrasubstituted amphiphilic CD bearing perfluoroalkylpropanethio chains [Peroche 2002, Bertino-Ghera 2008].

Besides the poly-substituted amphiphilic derivatives, others mono-substituted non-ionic amphiphilic CDs were obtained by grafting on the structure of parent CD, a single hydrophobic anchor such as long alkyl chain [Bellanger and Perly 1992; Lin 1998] or cholesteryl [Auzély-Velty 1999; 2000], phospholipidyl [Moutard 2002] or peptidolipidyl [Angelova 2008] moieties.

As can be seen, a large variety of amphiphilic CDs has been synthesized, each with specific properties and applications in medicine. Some of the resulting derivatives exhibited self-organizing properties and formed submicronic nanoaggregates. Many authors have published review articles on amphiphilic CDs self-assemblages [Roux 2007; Sallas 2008; Bilensoy 2008a; 2009], cationic CD-based gene delivery systems [Ortiz-Mellet 2010] or anionic CDs nanoparticles [Parrot-Lopez 2010]. In this paper, we focus specifically on non-ionic amphiphilic CDs substituted by alkyl chains which very promising materials are being explored for the development of nanoparticles for drug delivery and targeting.

3. Synthesis and characterization of amphiphilic cyclodextrins

Non-ionic alkylated CDs were mainly obtained by two pathway synthesis approaches such as organic and enzymatically-assisted syntheses.

3.1. Chemical synthesis pathway

The higher accessibility of the primary hydroxyl groups facilitates homogeneous functionalization at the narrower side of CD molecules, which has been used to synthesize amphiphilic CD derivatives bearing alkyl chains on their primary face with biodegradable bonds (amide or ester). Depending on the bond involved, two intermediate products were used for the modification of the parent β -CDs on the primary face: periodinated and peraminated β -CD. The 6-*N*-Capro- β -CD and 6-*N*-Myristo- β -CD which are β -CD modified on the primary side by respectively 6C or 14C aliphatic chain linked by amide bonds were obtained by reaction of peraminated β -CD with hexanoic anhydride or myristic acid, respectively. The 6-*O*-Capro- β -CD which is modified on the primary face by 6C aliphatic chain linked by ester bond was obtained by iodination of the primary hydroxyl groups following by reaction with cesium hexanoate in DMF [Memisoglu 2002]. Another one-step process for grafting directly dodecanoyl chains on the primary hydroxyl side of native β -CD by using lauric acid chloride in the presence of pyridine and HCl aqueous solution as quencher was reported by Gallois-Montbrun *et al.* [2007]. The latest amphiphilic derivatives have an average degree of substitution about 4.5 [Gallois-Montbrun 2007].

The main difficulty in the synthesis of amphiphilic CDs bearing alkyl chains on the secondary face is the regioselective functionalization of cyclic oligosaccharides, which is not easy to carry out. For a long time this has been an obstacle in obtaining quantitatively product selectively per-acylated on the secondary side with a satisfactory purity. Amphiphilic CDs bearing alkyl chains on the secondary face were originally prepared following a chemical synthesis pathway through the well-known tedious three-step procedure from parent α -, β -,

γ -CDs [Zhang 1991]. This synthesis approach requires an initial protection of primary alcohol functions (Figure 3) : i) protection of primary hydroxyl groups with *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) in dry pyridine, ii) acylation of secondary face by acyl groups bearing varying carbon chain lengths from C₆ to C₁₄ in the presence of 4-dimethylaminopyridine (DMAP), iii) deprotection of primary face by *tert*-butyl ammonium fluoride (TBAF) in tetrahydrofuran (THF) [Zhang 1991; Lesieur 2000; Dubes 2001; Gèze 2002]. In this procedure, the use of hexanoyl chloride leads to over-acylated products whereas the hexanoic anhydride leads to amphiphilic product with degree of substitution about 14 [Lesieur 2000, Dubes 2001].

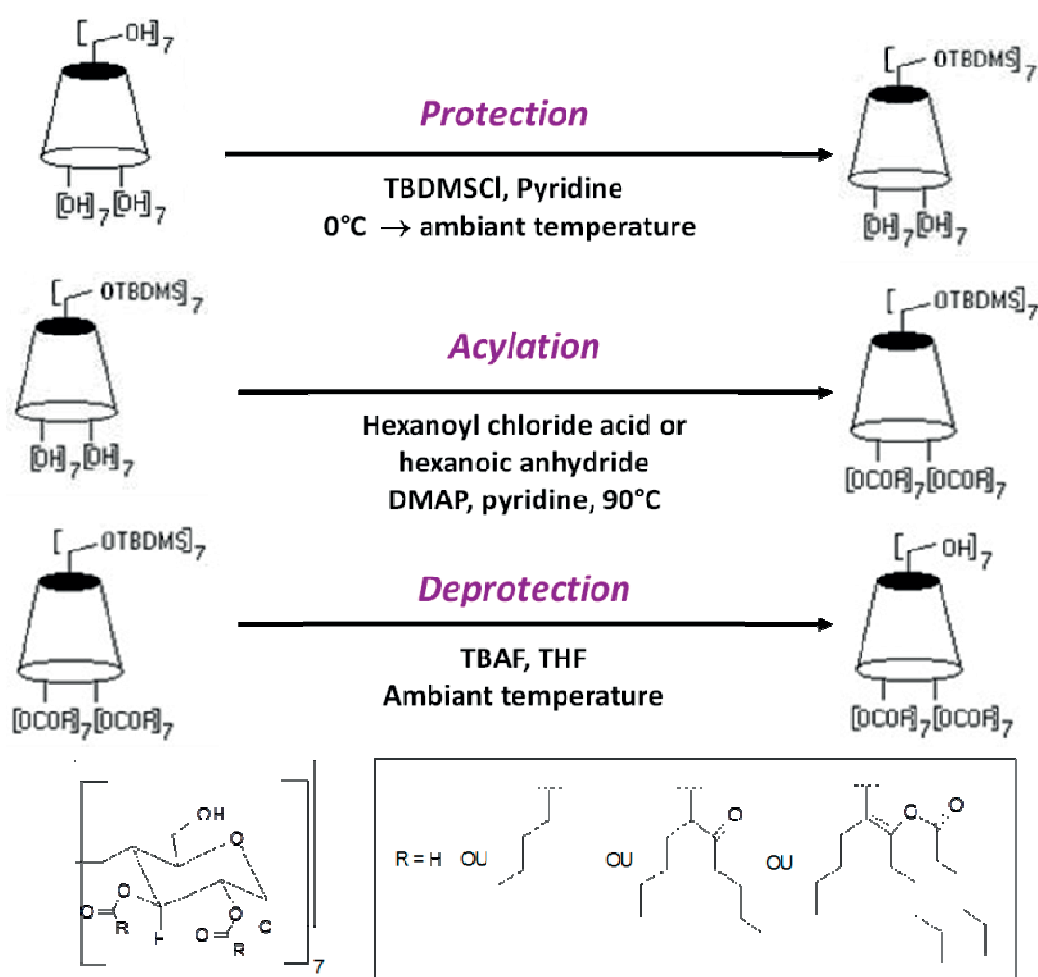


Figure 3: Scheme of amphiphilic β -CD- C_6 synthesis by chemical pathway (Adapted from Lesieur *et al.* 2000).

The products obtained appear in the form of a high statistical mixtures resulting from differently substituted compounds. The yield remains low (between 12 to 65 % according the conditions of reaction and the nature and quantities of reagents used) and the degree of acylation uncertain. Secondary reactions by self-condensation of alkyl chain donors in the

presence of DMAP are responsible of ramifications leading to the over-acylated species [Lesieur 2000; Dubes 2001]. This makes very difficult the characterization of synthesized products. Purification steps are also relatively time-consuming. The degree of substitution was determined by electrospray mass spectrometry (ES-MS). The presence of amphiphilic CD derivatives with 8 to 23 hexanoyl chains was shown [Gèze 2002]. The chemical synthesis pathway is long, fastidious and its scale is not conceivable.

3.2. Enzymatically-assisted synthesis

In a context of seeking an alternative approach to this tedious synthesis pathway, a one-step-catalyzed transesterification of parent CDs by vinyl-acyl esters in the presence of thermolysin as biocatalyser was developed [Pedersen 2005; Perez-Victoria 2006; Choisnard 2006]. This method, firstly described by Pedersen *et al.* [Pedersen 2005] and adapted by Choisnard *et al.* [Choisnard 2006], involves the use of a protease, *i.e.* thermolysin immobilized on celite, as biocatalyser of transesterification of parent CD with a vinyl fatty ester donor. The reaction is irreversible and occurs in one-step without prior protection of primary alcohols [Pedersen 2005; Choisnard 2006]. In addition, the conditions of reaction and the specificity of the enzyme allow a preferential acylation on the hydroxyl in position 2 of the CD molecule [Perez-Victoria 2006]. The reaction scheme implemented can be represented as follows.

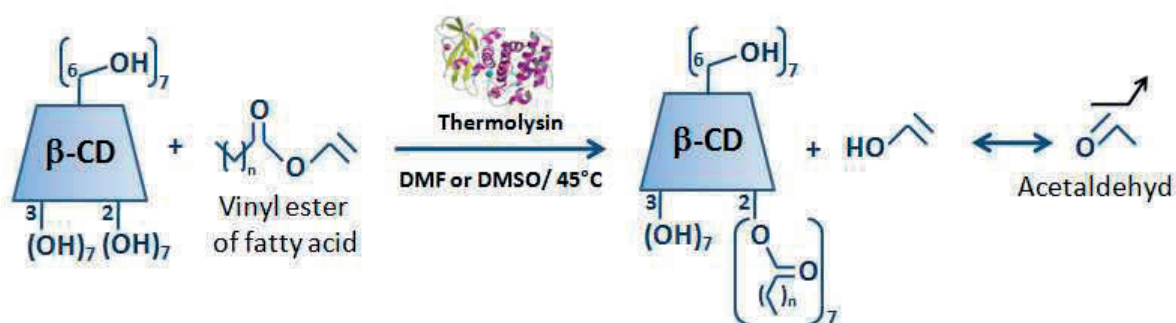


Figure 4. Schematic route of β -CD ester synthesis with thermolysin [Choisnard 2011].

This one-step biotransesterification of parent CD successfully resulted easily and quantitatively into different amphiphilic derivatives: α -, β - and γ -CDs, bearing alkyl chains from C_4 to C_{14} on their secondary face [Choisnard 2007; Gèze 2009; Choisnard 2011]. Further, a scaling up of the biosynthesis seems imaginable.

3.3. Physicochemical characterization of amphiphilic CDs

One of the objectives in terms of pharmaceutical formulations of amphiphilic CD colloidal drug carriers is to better understand the correlation between the chemical composition of the building-blocks and their capacity to self-assemble in the conditions of nanoprecipitation. It is therefore important to carry out a more fully characterization of amphiphilic CDs derivatives. Analytical techniques were mainly used to identify the chemical composition of the modified CDs derivatives as well as some physical characteristics usually associated to amphiphilic molecules, such as the lipophilic-hydrophilic balance (HLB) and the formation of Langmuir-Blodgett films [Tchoreloff 1995]. The degree of substitution is easily determined by electrospray-ionization mass spectrometry (ES-MS) or matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectroscopy (MALDI-MS) [Dubes 2001; Salameh 2005; Choisnard 2006; 2007; Kieken 2008; Gèze 2009; Choisnard 2011]. The average molecular weight, the total degree of substitution (TDS), the polydispersity of the species in the mixture and the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of α -, β - and γ -CD derivatives were accessed by using reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), MALDI-TOF and nuclear magnetic-resonance (NMR) spectroscopy analyses [Memisoglu 2002, Abdelwahed 2008, Choisnard 2011]. The substitution by alkyl chains at the positions 2, 3 or 6 of parent CDs was confirmed by $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ [Salameh 2005; Pedersen 2005; Choisnard 2006; Gallois-Montbrun 2007]. Typical heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) NMR analysis was also performed and showed that bioesterified CDs are mainly substituted in the C_2 position of the secondary face [Pedersen 2005; Choisnard 2006]. A complementary analysis based on RP-HPLC coupled to evaporative light-scattering detection (ELSD) was carried out on bioesterified CDs in order to separate the species according to the degree of substitution [Kieken 2008]. The Table 1 outlines the physicochemical characteristics of the different non-ionic amphiphilic CD derivatives grafting with alkyl chains mainly used as tools for particulate drug delivery systems.

Table 1.

Physicochemical properties of non-ionic alkylated CDs mainly used for preparing nanoparticles suspensions.

Parameters	Characterization techniques	Physicochemical characteristics	
		Chemically synthesized β -CD-C ₆	Bioesterified CD (α -CD-C ₁₀ , β -CD-C _n [*] , γ -CD-C ₁₀)
Mass yield		12-65 % (β -CD-C ₆) [Dubes 2001] 90-96 % (derivatives substituted on primary side) [Memisoglu 2002]	Total conversion of the maltosyl β -CD [Pedersen 2005]
Number of acylation	ES-MS and MALDI-MS	10-23 (β -CD-C ₆) [Dubes 2001]	2-7 (α); 3-8 (β); 5-9 (γ) [Choisnard 2006; 2007; 2011; Gèze 2009]
TDS**	RP-HPLC, ¹ H NMR and MALDI-MS	ND	3.8-6.6 (β -CD-C ₁₀) [Choisnard 2011]
Molecular weight (g/mol)	RP-HPLC, ¹ H NMR and MALDI-MS	3193 (β -CD ₂₁ C ₆) 2507 (β -CD ₁₄ C ₆) [Abdelwahed 2008] 2506 (β -CD-C ₆) 1820 (6-O-Capro- β -CD) 1813 (6-N-Capro- β -CD) 2597 (6-N-Myristo- β -CD) [Memisoglu 2002]	1774 (β -CD-C ₁₀ with TDS=3.8) 1953 (β -CD-C ₁₀ with TDS=5.3) 2156 (β -CD-C ₁₀ with TDS=6.6) [Choisnard 2011]
HLB	Estimated from TDS	5.6 (β -CD ₂₁ C ₆) 7.1 (β -CD ₁₄ C ₆) [Abdelwahed 2008] 8.9 (β -CD-C ₆) 11.1 (6-O-Capro- β -CD) 11.2 (6-N-Capro- β -CD) 7.8 (6-N-Myristo- β -CD) [Memisoglu 2002]	15.1 (β -CD-C ₁₀ with TDS=3.8) 14.0 (β -CD-C ₁₀ with TDS=5.3) 7.8 (β -CD-C ₁₀ with TDS=6.6) [Choisnard 2011]
Air-water interfacial properties	Analyzing the surface pressure-area isotherms	Surfactant properties: formation of Langmuir monolayer [Tchoreloff 1995]	ND

*n = 6, 8, 10, 12 or 14; ND= not determined, ** TDS = Total degree of substitution

As seen in the Table 1, the amphiphilic derivatives were a mixture of species with variable degree of substitution ranging from 2 to 9 and 10 to 13 alkyl chains for bioesterified and chemically synthesized products, respectively [Dubes 2001; Choisnard 2006; 2007; 2011; Gèze 2009]. The MS profile of biotransesterified β -CD-C₁₀ shown in Figure 5 highlights 6 species of 3 to 8 decanoic chains.

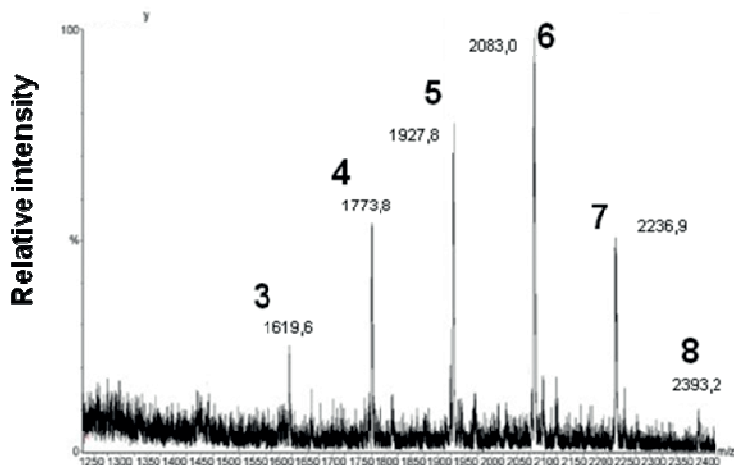


Figure 5. ES-MS spectrum of a β -CD- C_{10} mixture obtained directly after freeze-drying of the reaction medium. $(m+Na^+)/z = 1619.6$ (decanoate β -CD ester with 3 chains), $(m+Na^+)/z = 1773.8$ (decanoate β -CD ester with 4 chains), $(m+Na^+)/z = 1927.8$ (decanoate β -CD ester with 5 chains), $(m+Na^+)/z = 2083.0$ (decanoate β -CD ester with 6 chains), $(m+Na^+)/z = 2236.9$ (decanoate β -CD ester with 7 chains), $(m+Na^+)/z = 2393.2$ (decanoate β -CD ester with 8 chains) [Kieken 2008].

The presence of a degree of substitution greater than 6, 7 or 8 in the cases of α -, β -, γ -CD bioesters, respectively, evidences the possible attack of the hydroxyl groups in positions 3 and 6 during the thermolysin-catalyzed acylation process. As reported in the literature, it is well established that the regioselectivity of thermolysin against the hydroxyl in position 2 of glucopyranose units remains only partial, meaning that regio-isomers in position 3 or 6 in a given acylated species presenting the same degrees of substitution are expected [Perez-Victoria 2006]. Nevertheless, it is important to stress that the statistical mixture of bioesterified derivatives is much less complex than that of amphiphilic CDs obtained by the organic synthesis route. The HPLC-ELSD chromatographic profiles (Figure 6) clearly highlight the presence of position isomers [Kieken 2008].

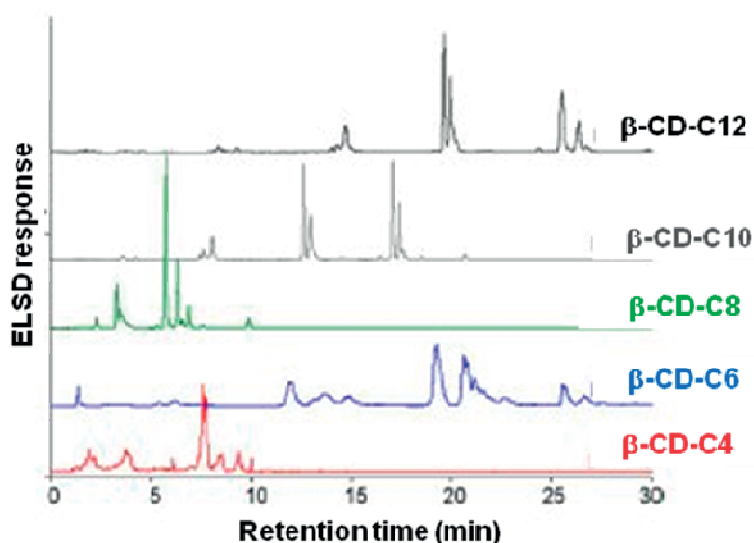


Figure 6. HPLC-ELSD chromatographic profiles of β -CD esters [Kieken, 2008].

The biocatalyzed synthesis pathway is simpler and leads to substantial yields of raw material and can be better controlled with regard to the chemical composition of the product. The finest characterizations performed at this stage allows to better understand and control the self-assembly of CD derivatives.

4. Supramolecular assemblies based on non-ionic alkylated amphiphilic cyclodextrins

4.1. Types of colloidal systems

Non-ionic alkylated amphiphilic CDs are molecular entities from which supramolecular edifices can be generated. According to the nature, the proportion and location of the substituent, different organized nano-architectures have been described such as micellar aggregates, bilayer vesicles, nanoparticles (matrix and reservoirs types) and more recently multi-layered nanostructures of bioesterified CDs.

Indeed, some derivatives of amphiphilic CDs are able to form in contact with water, stable micellar aggregates. These amphiphilic derivatives present some degree of solubility in water. This is the case, for example, for CDs mono-substituted on the primary side by a long aliphatic chain via an amine function. The grafted aliphatic chain has at its end a bulky group (terbutyl) that prevents its self-inclusion in the cavity of the CD [Lin 1998]. Amphiphilic CD derivatives poly-substituted on the secondary side with short aliphatic chains (C_2) also form micelles in water with a critical micellar concentration (CMC) of about $2 \cdot 10^{-7}$ M [Zhang 1991]. Stable micellar aggregates with a very low CMC value of about 2 orders magnitude smaller than those of usual surfactant, have also been described with the heptakis[6-alkylthio-6-deoxy-2-oligo(ethylene glycol) β -CD [Lombardo 2004].

Literature describes the formation of unilamellar vesicles in aqueous solution by some non-ionic amphiphilic derivatives such as alkylthio oligo(ethylene glycol) CDs [Falvey 2005; Ravoo 2000]. The formation of the lamella is highly dependent on the length of the alkyl chain. The derivatives with C_6 alkylthio chains self-assemble into dense nanoaggregates without any lamellar organization whereas those with C_{10} chains yielded unilamellar vesicles with an aqueous inner core and size ranging from 140 to 160 nm or 80 to 100 nm depending on whether they are prepared by extrusion or sonication, respectively. These vesicles exhibited a good stability over several days and combine the properties of liposome and CD macrocycles *i.e* the ability to associate water-soluble molecules in the inner core and lipophilic molecules in the cavity of CDs.

The amphiphilic CD poly-substituted with long alkyl chains (C_6 to C_{14}) either on the secondary side or primary face easily yields nanomatrix (nanosphere) or nanoreservoir (nanocapsule) type particles [Roux 2007; Sallas 2008; Bilensoy 2008; 2009].

4.2. Self-assembling properties of non-ionic amphiphilic CDs into nanoparticles

Non-ionic amphiphilic CD derivatives grafted on the primary side as those grafted on the secondary face with alkyl chains shown a good ability to self-organize into nanomatrix (nanospheres) or nanoreservoir (nanocapsules) structures (Figure 7). Indeed, when they are found in an energetically unfavorable environment, amphiphilic CDs self-aggregate in stable supramolecular nano-edifices.

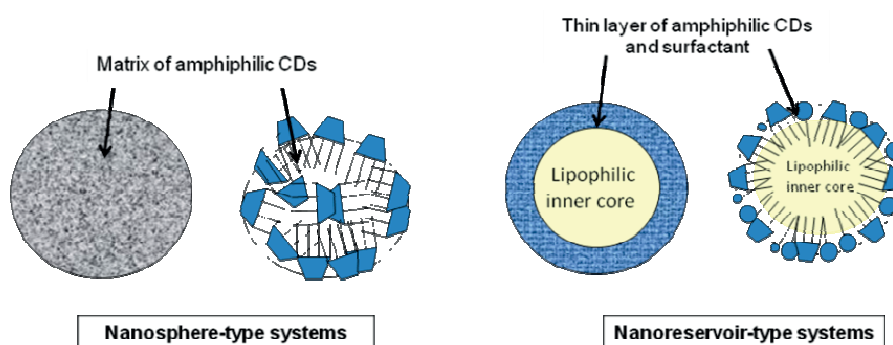


Figure 7: Schematic representation of amphiphilic CD based nanosphere and nanoreservoir-type systems.

Amphiphilic α -, β - and γ -CD nanosphere suspensions were mainly prepared using the solvent displacement method [Fessi 1988; Skiba 1992; 1996; Gèze 2002; 2004; Memisoglu 2003a; 2003b; Choisnard 2005]. The technique is based on a decrease in solubility of the modified CD initially dissolved in an organic solvent, in contact with an aqueous phase. The method involves using an organic solvent miscible with water such as acetone, ethanol or THF. These class III solvents with a low toxic potential are preferred. The method consists of injecting the organic phase containing amphiphilic derivatives, into aqueous phase *i.e* distilled water, added or not with a hydrophilic surfactant, under magnetic stirring. Nanoparticles spontaneously formed due to the desolvation of the material through the cross diffusion of the organic solvent in water via a mechanism of "diffusion-stranding" [Thioune 1997]. Afterwards, the organic solvent is removed under reduced pressure.

The particle size can be controlled by varying the technological parameters (agitation speed, temperature...) as well as the formulation parameters (nature of solvent, volume ratio organic

phase/water, presence and nature of surfactant ...) [Skiba 1992; 1996; Gèze 2002; Choisnard 2005; Gulik 1998]. Knowing that the particle size is of great importance for the *in vitro* and *in vivo* behavior of the nanocarriers [Moghimi 2001], a study was carried out by Choisnard *et al.* allowing the control of nanoparticle size during preparation. This objective was achieved by using a mixture design methodology in which an empirical correlation was found between the volume ratio organic phase/water and the nanoparticle size. With the output of this study, it is now possible to prepare amphiphilic CD nanoparticles with a predicted mean size varying from 50 to 400 nm [Choisnard 2005].

Generally speaking, the presence of surfactant is not required for obtaining nanosphere suspensions [Skiba 1996, Memisoglu 2003b]. Nevertheless the surfactant is necessary to stabilize the drug associated within the nanostructure [Skiba 1996].

The size and physical stability of formed nanospheres depend also on the structure of the amphiphilic CD implemented. The per-acylated β -CD, *i.e* chemically substituted on their secondary face by 14 hexanoic chains, do not lead to stable nanosphere suspensions even in the presence of a stabilizing agent while β -CD partially substituted self-assemble in similar conditions leading to a stable colloidal suspension of nanospheres [Gèze 2002]. It was also demonstrated, by using two complementary techniques (dynamic light scattering (DLS) and cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM)), that β -CD ester based aqueous colloidal suspensions of nanospheres (particle size about 70 nm) containing or not a stabilizing agent like poloxamer 188, display an excellent physical stability over a period of three years, without any special storage conditions [Gèze 2004].

The solid structure of amphiphilic CD based matrix-type systems was confirmed by TEM after cryo-fracture [Skiba 1996; Gulik 1998]. Also, the examination by X-ray scattering of nanosphere suspensions based on amphiphilic CD chemically acylated on the secondary face by alkyl chains of different lengths, revealed a matrix hexagonal or cubic structure [Gulik 1998].

All series of biotransesterified β -CD lead to supramolecular nano-aggregates in the absence of surfactant by using the solvent displacement technique except the derivative esterified by short alkyl chain (C_4) [Choisnard 2007]. The chemical structure of the CD derivatives (CD ring size, grafted chain length and TDS) and the preparation conditions impact significantly the size, the morphology and the structure of the nanoparticles [Choisnard 2006; 2007; 2011; Gèze 2009]. As previously observed with the chemical synthesis derivatives, increasing the volume ratio of water/organic solvent during the preparation process promote the reduction of the size of the nano-aggregates whose vary from 80 to 230 nm [Choisnard 2007]. The use

of imaging technique (Cryo-TEM) showed that, depending on the grafted alkyl chain length of bioestrified β -CD series, various architectures composed of the stacking of modified CD molecules were produced. Spherical and dense nano-objects without apparent inner organization (β -CD- C_6 particles), barrel-shaped nano-objects exhibiting lattice fringes (β -CD- C_8 , β -CD- C_{12} and β -CD- C_{14} particles) and onion-like solid nano-aggregates with a multilamellar structure were evidenced (Figure 8) [Choisnard 2007].

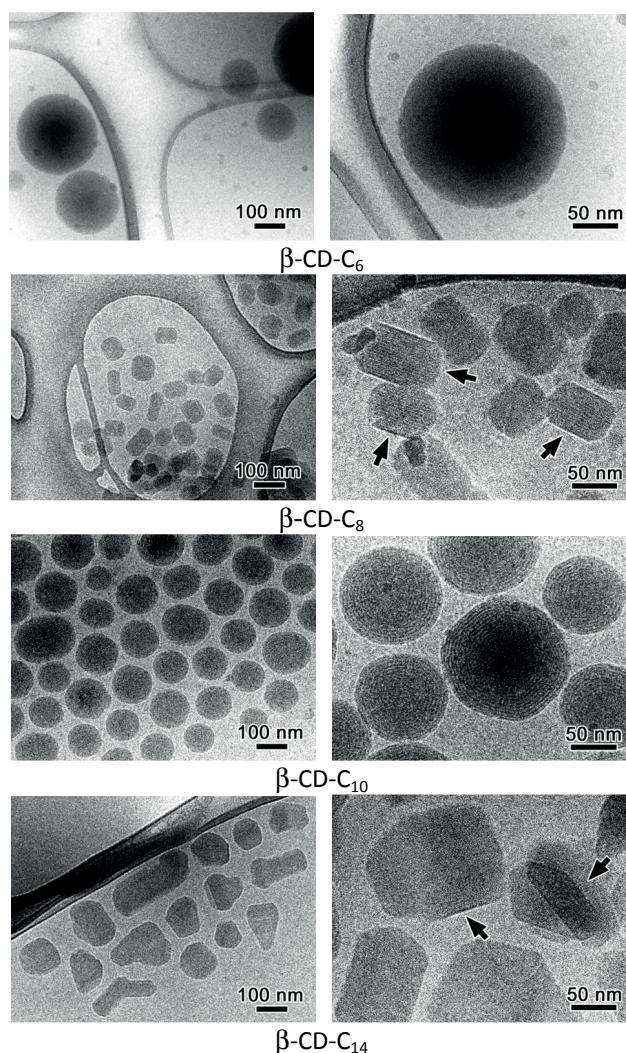


Figure 8. Cryo-TEM images of β -CD esters nanoparticles embedded in vitreous ice, recorded at two different magnifications. The black arrows indicate parallel fringes [Choisnard 2007].

In the case of β -CD- C_{10} , it has also been observed sometimes, hexagonal objects with concentric bilayers surrounding a parallel fringe like “crystal” core. Molecular modeling was used to describe the association modes of β -CD- C_{10} molecules in the bilayer. The lamellar model is shown in Figure 9. For this model, β -CD rings are connected by their primary faces forming dense hydrophilic layers, while the alkyl chains form hydrophobic layers of low

density. The estimated lateral periodicity of 4 nm is consistent with the cryo-TEM observations [Choisnard 2006].

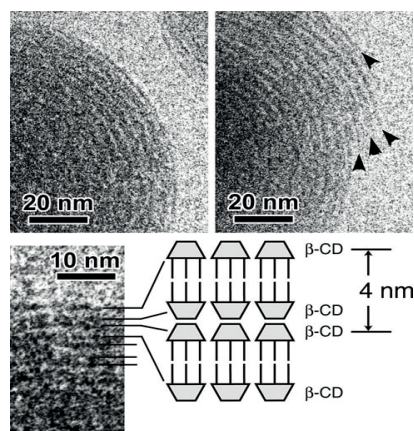


Figure 9. Molecular model describing the lamellar structure formed by β -CD- C_{10} molecules [Choisnard 2006].

Under similar formulation conditions, β -CD- C_{10} derivative lead to nano-assemblies of others morphologies than those described above. In these cases, the raw material is composed of molecular species less dispersed and more substituted compared to those giving rise to lamellar structures.

By controlling the proportion of vinyl decanoate implemented, different biosynthesized batch characterized by variables TDS were obtained and complementary imaging and diffraction (TEM after negative staining and small-angle X-ray scattering (SAXS)) analysis of suspensions allowed to establish a correlation between the morphology and the structure of the particles and the TDS of the β -CD- C_{10} as showed in figure 10. The result showed that β -CD- C_{10} could self-assemble either into spherical particles with lamellar structure (in low TDS about 4), either barrel-shaped particles presenting hexagonal structure (in high TDS about 6.6), or mixed structure corresponding of the coexistence of lamellar and hexagonal regions (in intermediate TDS about 5.3). However, the cell parameter (4.71 nm for the lamellar structure and 4.45 for the hexagonal structure) is not significantly affected by the TDS of the β -CD- C_{10} derivative [Choisnard 2011].

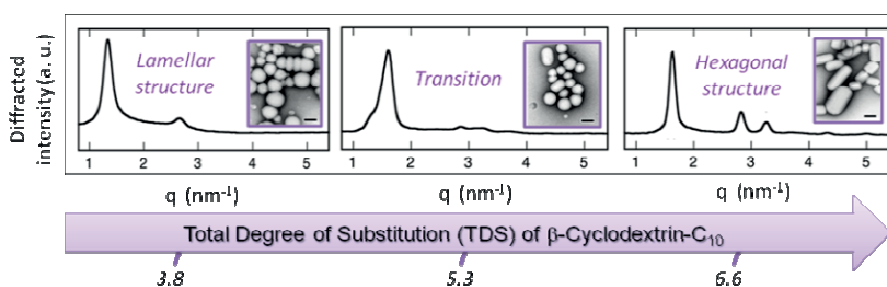


Figure 10. TEM images after negative staining and SAXS profiles of suspensions of β -CD- C_{10} nanoparticles with different total degree of substitution (TDS) [Choisnard 2011].

The change in morphology and structure seems to take place to a TDS close to 5. This general trend has not yet been extended to bioesterified β -CD derivatives of different chain length and derivatives of series α and γ . These preliminary results showing an influence of TDS on the morphology and the structure of bioesterified β -CD- C_{10} nanoparticles are a step forward in understanding the physicochemical parameters influencing the self-organization of molecular entities. Further investigations are in progress with the aim to fully correlate the chemical composition of bioesterified CD derivatives with their self-assembled capacity.

The bioesterified α -CD- C_{10} and γ -CD- C_{10} derivatives also self-organize into nanoscale particles with different sizes and shapes extending the range of supramolecular architectures already observed with the β -CD series (Figure 11). Indeed, the negatively stained TEM images of particles from α -CD- C_{10} (average diameter of 100 to 180 nm) suggest polygonal objects while particles from γ -CD- C_{10} smaller (average diameter of 100 to 120 nm) and less polydisperse, exhibited spherical and sometimes slightly polygonal shape [Gèze 2009].

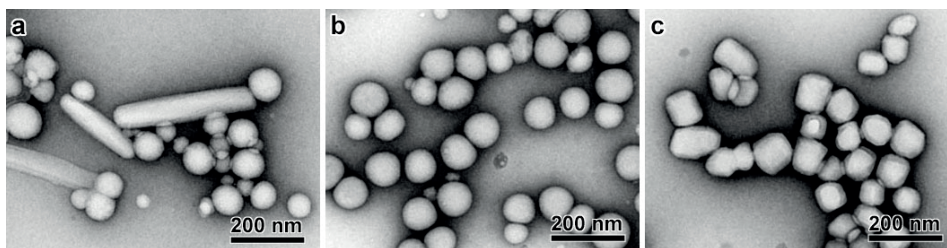


Figure 11. TEM images after negative staining of suspensions of bioesterified α -CD- C_{10} (a), β -CD- C_{10} (b) and γ -CD- C_{10} (c) nanoparticles.

The ability of these amphiphilic CDs to self-assemble into nanodevices of different size, shapes and structures is a very important feature. Thanks to the coupling of MALDI-TOF mass spectrometry, NMR and HPLC, a correlation was established between the physicochemical characteristics of bioesterified CD derivatives and the morphological and structural characteristics of nano-aggregates. At the contrary, this correlation is difficult to establish with CD esters obtained by chemical way, because the statistical mixtures are difficult to control by this latest synthesis process.

In addition to the first approach to prepare nanosphere suspensions of amphiphilic CD, the emulsion solvent evaporation method has also been successfully used [Lemos-Senna 1998a; Quaglia 2009; Stancanelli 2010; Cannava 2010]. In this technique, the presence of surfactant is required for nanospheres formation. Suspensions of polydisperse and less spherical nanospheres were obtained, in comparison to those obtained by nanoprecipitation method [Lemos-Senna 1998a]. The amphiphilic CD nanosphere suspensions were found stable under strongly acidic or alkaline medium, when prepared in the presence of surfactant.

They become disorganized and precipitate under the same conditions of pH in the absence of surfactant [Skiba 1992]. However, the use of high concentration of non-ionic surfactants can destabilize the matrix structure of the nanospheres and lead to the formation of mixed micelles surfactant/ amphiphilic CDs. This formation of mixed micelles is reversible and enabled to propose another method to prepare amphiphilic CD based colloidal suspensions from dialyzed or diluted mixed micelles [Lemos-Senna 1998b].

Amphiphilic CDs based reservoir-type suspensions (systems consisting of a lipophilic inner core surrounded by a thin layer of amphiphilic CDs) are also prepared using the nanoprecipitation technique previously described. The only difference being the addition to the organic phase, a lipophilic component *i.e* triglycerides of fatty acids (Miglyol 812[®]: triglycerides of caprylic and capric acids) or benzyl benzoate dissolved [Fessi 1986; Skiba 1992b; Memisoglu 2002; Gèze 2009]. The nanocapsules are formed spontaneously upon addition of the lipophilic phase to the hydrophilic phase. Adding one or two surfactants is necessary to stabilize the membrane of the nanocapsule.

The size of the nanocapsules is greater (average diameter about 200 nm) than the corresponding nanospheres (average diameter about 100 nm). TEM after negative staining of colloidal suspensions of nanoreservoir systems showed that the particles flattened and coalesced during drying. Consequently, the size and morphology cannot be reliably determined. Thus, cryo-TEM images of the quench-frozen suspension were recorded and showed individual soft spherical particles [Gèze 2009]. The reservoir structure was already demonstrated by observation of nanocapsule suspensions by TEM after cryo-fracture [Skiba 1992b; Memisoglu 2002].

The small size, the variety of supramolecular architectures and the good physical stability of self-assembled amphiphilic CD-based nanosystems make them attractive for drug delivery particularly by parenteral route. For this purpose, it has been shown that gamma irradiation allowed the sterilization of amphiphilic CD suspensions (nanosphere and nanocapsule) without significant alteration of their *in vitro* properties [Memisoglu 2006].

One of a major concern is the determination of the ultrastructure of the amphiphilic CD nanoparticles. Our previous results showed possible hexagonal or lamellar internal organization of some CD nanoparticles [Choisnard 2006, 2007, 2011, Gèze 2009]. However, further works involving complementary tools *i.e* X-ray diffraction, molecular modeling as well as solid state NMR have to be carried out to completely solve the internal supramolecular organization of these nanodevices. In addition, in the perspective of *in vitro* and *in vivo* biological assessments of amphiphilic CD colloidal carriers, the determination of some parameters such as particles surface area, density and the number of particles per unit of

volume, is important and required and should be performed. Indeed, it was demonstrated that these parameters vary with the nature and the concentration of the constituents in the aqueous suspension [Vauthier 1999].

5. Potential applications of amphiphilic cyclodextrin colloidal carriers in drug delivery

A large number of researches have been performed in order to develop amphiphilic CD colloidal carriers for delivery of bioactive molecules. Interesting results were found such as solving the problem of insolubility and/or instability in aqueous media of known molecules, enabling their *in vivo* administration. *In vivo* studies on animal were also performed and evidenced the biodistribution profiles of these nanosystems or the activity of associated anticancer drugs on tumor models. The current section of this review will focus on the behavior of non-ionic alkylated amphiphilic CD-based nanodevices related to drug association capacity, drug release, and *in vitro* and *in vivo* performances for drug delivery.

5.1. Drugs association and release

Modified CD-based nanoparticles are described in the literature as carriers able to incorporate and release drugs through adequate experimental conditions.

5.1.1. Capacity to associate drug

The capacity of non-ionic CD alkyl-ester colloidal carriers to associate drug molecules has been shown with poorly water-soluble ones having a good potential in biomedical applications such as steroid drugs (testosterone, progesterone, hydrocortisone, antifungal (amphotericin B, bifoconazole, clotrimazole), anti-inflammatory (indometacine), anticancer (tamoxifen, paclitaxel, camptothecin, docetaxel, genistein), anticancer drug-resistance modulator (acridone derivative), anxiolytic (diazepam) and antihypertensive (nimodipine) (Table 2).

The pharmaceutical applications of these drug molecules are sometime limited by their formulation and delivery problems namely poor aqueous solubility, poor chemical stability in biological medium, high toxicity, severe side-effects, etc... The rational of using amphiphilic CDs nanoparticulate carriers as an alternative for these drugs administration are summarized as followed: to improve the solubility of drug molecules, to protect them against degradation, to enhance their absorption and to modify their pharmacokinetic profiles. It could also expected that the amphiphilic CDs nanostructures differ from other nanosystems (*i.e.*, polymer nanoparticles) by the presence of the CD which possesses an apolar cavity able to

encapsulate and protect drug molecules, resulting in enhancement of their bioavailability via a complexation phenomenon and/or absorption-enhancing properties of CDs.

Three methods are commonly described in the literature for drug association into amphiphilic CD nanodevices. The first and conventional method described by Skiba *et al.* is the commonly used. In this process, the drug is directly dissolved in the organic phase during the preparation of the colloidal suspension. Two other processes using preformed amphiphilic CD/drug inclusion complex have been described by Memisoglu *et al.* [Memisoglu 2003a; 2003b]. In each case, the amount of drug associated to the nanostructure depends on various parameters including the nature (macrocycle ring size, grafted alkyl chain length...) and quantity of the amphiphilic CD involved, the physicochemical characteristics (molecular weight, aqueous solubility, log *P*...) and the amount of the drug implemented, also the presence of surfactant [Skiba 1996a; Lemos-Senna 1996; Memisoglu 2006a; Gèze 2009]. High association yields close to 90% were observed [Gèze 2009].

It is well known that the solvent displacement technique allows to associate significant amounts of drug with a large part that is adsorbed on the surface [Lemos-Senna 1996]. Thereby, the introduction of surfactant promotes the contact between the hydrophobic drug and the particle surface allowing better integration of the active substance to the nanostructures [Leroy-Lechat 1995; Skiba 1996a; Lemos-Senna 1996]. Different localizations of the drug molecule within the nanostructure including fixation to specific sites via hydrophobic bonds [Lemos-Senna 1996] and possible interaction with the CD cavity during the self-organization step are hypothesized [Gèze 2009].

In the case of amphiphilic CD nanocapsules suspensions, the drug loading is done directly by introducing the drug molecule in the organic phase. The hydrophobic drug molecules are dispersed in the lipophilic inner core of the nanocapsules. Higher drug loading rates were obtained, owing to the sufficient affinity of these drug molecules for the lipophilic inner phase of the reservoir structures [Skiba 1995, 1996b, Memisoglu 2006a, Bilensoy 2008b; Gèze 2009]. However, different physicochemical determine the drug association efficiency namely the chemical nature and the polarity of the drug. The maximum solubility of the drug in the lipophilic inner phase is one of the criteria for the lipophilic phase selection and defining initial concentration when starting preparation of the drug-loaded colloidal reservoir suspensions [Skiba 1996b, Gèze 2009].

Non-ionic alkyl-CD nano-assemblies were also investigated in the incorporation of hydrophilic drug molecules such as doxorubicin, metronidazole and proteins (PA-I lectin and insulin). The table 2 summarizes the different drug-loaded amphiphilic CD colloidal carriers developed. Insulin was entrapped in mixed non-ionic amphiphilic CD esters/polymers

nanoparticles. The biodegradable copolymer of lactic and glycolic acids (PLAGA) was used. This polymer is well known to form aqueous nanodispersions in the conditions nanoprecipitation [Vauthier 2009] and has been studied for their ability to associate insulin [Bilati 2005]. The results shown that mixing bioesterified CD derivatives with PLAGA lead to stable nanoparticles with low polydispersity index as well as a good insulin association yields [Soares 2009].

Table 2.

Formulated drugs with amphiphilic CDs colloidal carriers.

Drug	Nanosystem (lipophilic inner core)	Amphiphilic CD	Reference
Progesterone	Nanospheres	γ -CD-C ₆	[Lemos-Senna 1996]
	Nanospheres/Nanocapsules (Miglyol [®] 812)	β -CD-C ₆	[Memisoglu 2006a]
	Nanospheres	β -CD-C ₆ and 6- <i>N</i> -Capro- β -CD	[Memisoglu 2003b]
	Nanocapsules (Benzyl benzoate)	β -CD-C ₆	[Skiba 1996b]
Testosterone	Nanospheres/Nanocapsules (Miglyol [®] 812)	β -CD-C ₆	[Memisoglu 2006a]
Hydrocortisone	Nanospheres/Nanocapsules (Miglyol [®] 812)	β -CD-C ₆	[Memisoglu 2006a]
Amphotericin B	Nanocapsules (Benzyl benzoate)	β -CD-C ₆	[Skiba 1996b]
Bifonazole	Nanospheres	β -CD-C ₆ and 6- <i>N</i> -Capro- β -CD	[Memisoglu 2003a]
Clotrimazole	Nanospheres	β -CD-C ₆ and 6- <i>N</i> -Capro- β -CD	[Memisoglu 2003a]
Tamoxifen citrate	Nanospheres/Nanocapsules (Miglyol [®] 812)	β -CD-C ₆	[Memisoglu-Bilensoy 2005; 2006a]
Paclitaxel	Nanospheres/Nanocapsules (Miglyol [®] 812)	6- <i>O</i> -Capro- β -CD	[Bilensoy 2008b; c]
Camptothecin	Nanospheres	β -CD-C ₆ and 6- <i>O</i> - Capro- β -CD	[Cirpanly 2009]
Docetaxel	Nanospheres	SC16OH	[Quaglia 2009]
Genistein	Nanospheres	SC6OH	[Stancanelli 2010; Cannava 2010]
Acridone derivative	Nanocapsules (Benzyl benzoate)	γ -CD-C ₁₀	[Arnaud 2011]
Diazepam	Nanospheres/Nanocapsules (Miglyol [®] 812)	α -, β - and γ -CD-C ₁₀	[Gèze 2009]
Indomethacin	Nanocapsules (Benzyl benzoate)	β -CD-C ₆	[Skiba 1996b]
Nimodipine	Nanospheres/Nanocapsules (Miglyol [®] 812)	β -CD-C ₆	[Memisoglu-Bilensoy 2006b]
Doxorubicin	Nanospheres	β - and γ -CD-C ₆	[Leroy-Lechat 1994]
Metronidazole	Nanospheres	β -CD-C ₆	[Lahiani-Skiba 2006]
PA-I lectin	Nanospheres	SC6CD _{Gal} and SC6CD _{Glu}	[Mazzaglia 2006; Micali 2006]
Insulin	Nanospheres	γ -CD-C ₁₀ /PLAGA mixture	[Soares 2009]

SC6CD_{Gal} = alkylthio-CD galactosylated, SC6CD_{Glu} = alkylthio-CD glucosylated

In order to characterize either the physical state of entrapped drug molecule into the structure of the amphiphilic CD nanocarriers or the influence of adding drugs on the nanoparticle structures, different techniques such as differential scanning calorimetry (DSC), wide angle X-ray scattering (WAXS), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and

solid-state NMR were commonly used. Many of these experiments evidenced molecularly dispersed drugs within the amphiphilic CD nanostructures [Lemos-Senna 1996; Bilensoy 2008b].

5.1.2. *In vitro* drug release from amphiphilic cyclodextrin nanocarriers

The *in vitro* release of drug from amphiphilic CD nanocarriers has been assessed under perfect sink conditions using many approaches such as dilution-ultracentrifugation, dilution-centrifugal ultrafiltration or dialysis techniques. In most cases, biphasic release profiles were observed with a high drug release in the early stages. The initial release can be very high, up to about 60-80% in the two first hours [Gèze 2009; Memisoglu 2005], or moderate of about 30 to 40% [Gèze 2009; Cirpanly 2009]. This burst-release is followed by a slow release of the drug remaining, over 48, 96 or 120 hours [Gèze 2009; Memisoglu 2003]. Shorter release time of about 6 hours [Memisoglu 2005] or longer extended up to 300 hours, were found in some cases [Cirpanly 2009].

The release profile from nanomatrix depends greatly on the physicochemical characteristics of the associated drug and the nature of amphiphilic CD used (macrocycle ring size, alkyl chain length and the binding site of the alkyl group). The sequential release of drug from nanoparticles may be related to the different localizations of the drug molecule within the nanostructure: initial release of free drug located on the surface of nanocarriers and then delayed release of drug located within the matrix structure. The sustained release of drug from particles in some cases indicated that the drug was more sequestered by the nanostructure.

It was observed in a study dealt with diazepam (DZ)/bioesterified CD nanospheres that the ring size of the parent CD used (α -, β - or γ -CD) may influence the release pathway of associated DZ. A more sustained *in vitro* extraction of DZ was obtained with γ -CD-C₁₀ in comparison to α - and β -CD-C₁₀ nanospheres (Figure 12a) [Gèze 2009], suggesting that the drug was more retained by the γ -CD-C₁₀ nanostructure. Thus, the DZ interaction with the cavity of γ -CD-C₁₀ may be considered. Besides the CD ring size and the drug itself, the site of CD modification also seems to influence the drug release from amphiphilic β -CD nanocarriers. Indeed, different release profiles of camptothecin from β -CD-C₆ (modified on the secondary face) and 6-O-Capro- β -CD (modified on the primary face) nanoparticles extended up to 6 and 12 days respectively, were obtained by Cirpanly *et al.* [Cirpanly 2009]. The more specific case concerns the nanoparticles made from heptakis (2-O-oligo(ethyleneoxide-6-hexadecylthio)-) β -CD which resulted in very slow release of associated docetaxel for about two months due to the crystalline nature of obtained nanoparticles

[Quaglia 2009].

The drug release from the nanocapsules is also biphasic, but the pathway of drug release differs from that of nanospheres. The initial release is slower and the total release time is shorter, maximum 96 hours (Figure 12b) [Gèze 2009]. The *in vitro* release profiles from reservoir systems suggest that the release of drug located within lipophilic core of the reservoirs is mainly governed by the drug partition between the oil core and the aqueous external medium and the diffusion of drug through the reservoir shell.

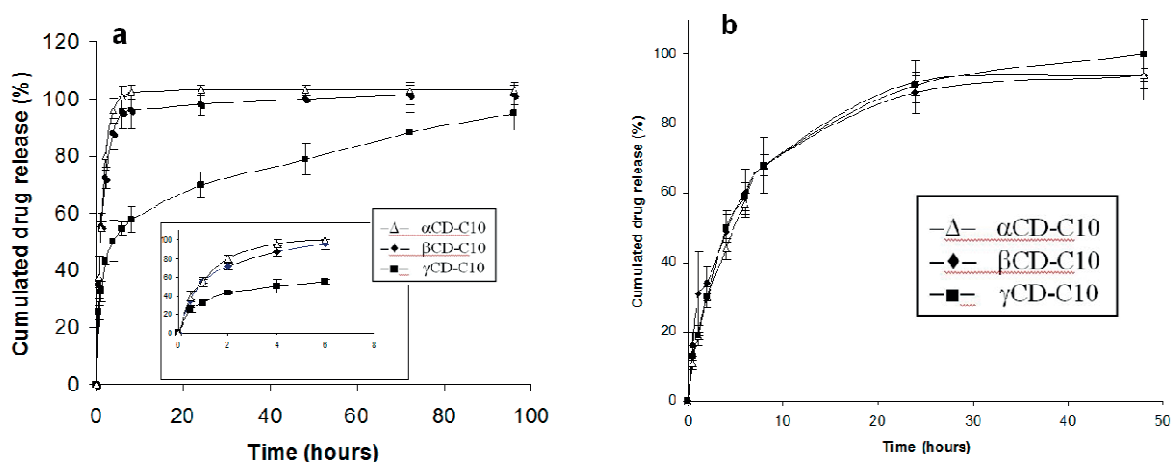


Figure 12. Diazepam release profiles from α -, β - and γ -CD-C₁₀ nanosphere (a) and nanoreservoir particles [Gèze 2009].

5.2. Bioevaluation of amphiphilic cyclodextrin colloidal carriers

The potential pharmaceutical applications of non-ionic amphiphilic CD nanocarriers have been confirmed by a number of assessments including *in vitro* safety (hemolytic and cytotoxic properties), *in vivo* biodistribution and the efficacy of drug-loaded systems on tumor cell lines (*in vitro*) as well as on animal model (*in vivo*).

5.2.1. *In vitro* hemolytic properties

Non-ionic amphiphilic CD nanospheres and nanocapsules were evaluated for their hemolytic properties on human red blood cells [Memisoglu 2003; Bilensoy 2008c; Quaglia 2009].

Regarding the raw material, it has been described that the amphiphilic CDs 6-*N*-Capro- β -CD (modified on the primary face with C₆ aliphatic chains with amide bond) and β -CD-C₆ (modified on the secondary face with C₆ aliphatic chains with ester bond) were both less hemolytic than the native β -CD. In the other hand, the β -CD-C₆ hemolytic profile was lower than those of 6-*N*-Capro- β -CD [Memisoglu 2003]. The following order of hemolytic activity was showed: β -CD > 6-*N*-Capro- β -CD > β -CD-C₆.

When considering the 6-O-Capro- β -CD made nanoparticles (nanospheres and nanocapsules), a significant less hemolytic effect was observed in comparison to the commercial injectable vehicle of paclitaxel (cremophor/ethanol mixture), with the most favorable hemolytic profile obtained with nanospheres [Bilensoy 2008c]. The hemolytic potential of docetaxel-loaded and unloaded nanoparticles made from heptakis (2-O-oligo(ethyleneoxide-6-hexadecylthio)-) β -CD (SC₁₆OH) was also carried out in comparison to commercial docetaxel formulation (Taxotere[®]) and native β -CD. Unloaded and docetaxel-loaded SC₁₆OH nanoparticles were demonstrated non-hemolytic in the concentrations range of 0.01 to 2 mg.mL⁻¹ whereas native β -CD and Taxotere[®] exhibits hemolytic effects in this concentration range [Quaglia, 2009].

A concentration-dependant hemolytic profile was reported by all authors, but the building blocks as well as the nanocarriers obtained were non-hemolytic in the concentration range applied for therapeutic use.

5.2.2. *In vitro* cytotoxic properties

Non-ionic amphiphilic CD nanospheres and nanocapsules were also evaluated for their cytotoxic properties particularly on L929 mouse fibroblast [Memisoglu-Bilensoy 2006b; Bilensoy 2008c; Cirpanly 2009] and human polymorphonuclear (PMN) cells [Memisoglu 2006b] using the methylthiazolyltetrazolium (MTT) assay.

These studies revealed that the cytotoxicity profile of amphiphilic CD nanocarriers was influenced by various parameters such as the presence and the concentration of surfactant. Nevertheless, the surfactant concentration of 0.1% in the formulation gave similar toxicity results than non-surfactant nanospheres [Memisoglu 2006b]. The unloaded β -CD-C₆ and 6-O-Capro- β -CD nanospheres and nanocapsules were slightly less cytotoxic on L929 and PMN cells [Memisoglu 2006b, Cirpanly 2009] than PLGA and poly- ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles, considered as non-cytotoxic [Vauthier 2009]. Moreover, no significant difference was observed between the fibroblast cells viability values of nanosphere and nanocapsule systems [Bilensoy 2008c].

5.2.3. *In vitro* efficacy of drug-loaded amphiphilic cyclodextrin nanosystems

The therapeutic potential of drug-loaded colloidal nanocarriers based on non-ionic amphiphilic CDs was first evaluated through *in vitro* efficacy studies.

For example, Antifungal (bifonazole and clotrimazole) loaded with 6-N-Capro- β -CD and β -CD-C₆ nanospheres have been shown to enhance the *in vitro* antimicrobial activity on

cultured *candida albicans* strains, with very lower minimum inhibitory concentration than drug ethanolic solutions [Memisoglu 2003].

In addition, the *in vitro* efficacy experiments of anticancer-loaded non-ionic amphiphilic CD nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells [Memisoglu 2005; Bilensoy 2008c; Cirpanly 2009] or Human Caucasian larynx carcinoma epidermoid cells (HEp-2) [Quaglia 2009] showed the followings results:

- Tamoxifen-loaded and paclitaxel-loaded nanospheres and nanocapsules of β -CD₆ or 6-O-Capro- β -CD displayed an equally *in vitro* cytotoxic effect against MCF-7 breast cancer cells as tamoxifen solution in acetone or paclitaxel solution in cremophor/ethanol [Memisoglu 2005; Bilensoy 2008c].
- Camptothecin exerts a higher anticancer efficacy against MCF-7 cells when associated to amphiphilic CD nanocarriers comparatively to PLGA and PCL nanoparticles [Cirpanly 2009].
- The HEp-2 cells exhibit more susceptibility to docetaxel-loaded SC₁₆OH nanoparticles with greater cell death and cell damage as compared to free docetaxel [Quaglia 2009].

Amphiphilic CD nanosystems resulted in more favourable *in vitro* characteristics including *in vitro* efficacy of drug-loaded nanoparticles and nanocapsules. These *in vitro* investigations highlight an important potential of amphiphilic CD colloidal carriers particularly in the delivery of anticancer agents. It is believed that formulating drug with amphiphilic CD particles was at least comparable to the other polymeric material such as PLGA and PCL. CD particles exhibited a lower toxicity against usual cells like erythrocytes, fibroblasts and PMN cells and showed significant *in vitro* efficacy. However, it is important to note that comparative studies are relatively scarce in this area.

5.2.4. *In vivo* efficacy of drug-loaded amphiphilic cyclodextrin nanosystems

Bioesterified γ -CD-C₁₀ based reservoir-type nanosuspensions were used to assess the *in vivo* drug-resistance modulator properties of an acridone derivative (MBLI-87), which have a low aqueous solubility. The administration of this suspension by intraperitoneal (ip) route allowed determining the highest nontoxic dose of the MBLI-87 in mice. On the other hand, ip injection of MBLI-87 nanosuspension, in association with irinotecan (CPT-11), revealed the *in vivo* modulator effect of MBLI-87 on xenograft model over-expressing the BCRP (ABCG2-HEK293) [Arnaud 2011]. This experiment also showed that the colloidal suspensions with or without MBLI-87 were relatively well tolerated by the animals, despite repeated injections of 300 μ L/week during two cycles of chemotherapy of 15 days interrupted by a period of 15 days without treatment [Arnaud 2011].

Cirpanly *et al.* have evaluated the *in vivo* potential on 9L rat brain tumor model after convection enhanced delivery of another anticancer drug, the camptothecin, loaded with amphiphilic β -CD (β -CD-C₆ and 6-O-Capro- β -CD) nanoparticles. The result indicated that camptothecin loaded 6-O-Capro- β -CD nanoparticles modified significantly the growth and lethality of 9L glioma tumors with high survival rate in tumor-induced rats [Cirpanly 2011].

These *in vivo* assessments reinforce the results already obtained *in vitro* indicating that amphiphilic CD nano-devices may provide a promising carrier system to exploit for the effective delivery of anticancer drug.

In the context of optimizing the therapy of cancer, it would be advisable to continue the studies of amphiphilic CD nanocarriers loaded with anticancer or drug-resistance modulator drugs. Based on the results, an attempt could be done to explain the mechanisms by which these nanosystems improve the therapeutic index of the active substances involved. This will position the modified CD vectors in the highly competitive development of nanomedicine, among other colloidal systems described in the literature in terms of capacity of drug association, safety and antitumor efficacy. The *in vitro* and *in vivo* (in healthy animals) inherent toxicity of those nano-vectors must be addressed systematically in this case. Indeed, the *in vivo* tolerance of the nanoparticles without drug is an essential parameter to know which impact on biomedical applications. Finally, the capacity of non-ionic amphiphilic CD particles to be accumulated and entrapped in tumors by enhanced permeation and retention (EPR) effect could be also evaluated using *in vivo* fluorescence imaging in induced tumor models [Goutayer 2010]. Indeed, the phenomenon of EPR effect is a tumor characteristic identify by Maeda *et al.* as means to target anticancer agents to tumor and has been used to explain the efficacy of nanoparticles accumulation in tumor [Matsumura 1996; Maeda 2000]. Achieving these *in vivo* evaluations will be an important advance in the domain of non-ionic amphiphilic CD nanocarriers.

Finally, the insulin loaded γ -CD-C₁₀/PLAGA nanoparticles demonstrated an earlier hypoglycemic effect, more persistent and higher in intensity after subcutaneous injection in male wistar rats, compared to the formulation PLAGA-insulin. Within the experiments conducted, it appears that the insulin activity was not compromised when the drug was formulated with either system and γ -CD-C10 influence favorably the *in vivo* becoming of insulin [Soares 2009].

5.2.5. *In vivo* biodistribution of amphiphilic CD nanocarriers

One important step in the development of colloidal carriers for drug delivery or targeting consists in investigating their *in vivo* behavior. The *in vivo* fate of amphiphilic CD

nanocarriers is reported in only one study and concerns the intravenous administration [Gèze 2007]. Indeed, in order to monitor their biodistribution after intravenous injection, unloaded nanospheres containing ¹²⁵I-radiolabeled amphiphilic β -CD were administered in mice. This study highlighted that these colloidal carriers have a very short circulation time in the vascular compartment (about 10 minutes) resulting from their interactions with mononuclear phagocyte system (MPS), and accumulated in the liver and spleen [Gèze 2007]. They behave like hepatosplenic tropism vectors.

These results show that functional improvements must be performed particularly in terms of developing amphiphilic CD drug nanocarriers which are invisible to MPS. Indeed, it is now well established that the passive targeting to reach the tumor sites via systemic administration of colloidal carriers conveying drug requires to confer to the nano-vehicle a suitable size (ranging from 50 to 200 nm) and a stealth character, allowing thus a sufficient vascular circulation time [Moghimi 2001; Hoarau 2004; Vonarburg 2006a]. The majority of colloids, whether based on non-ionic surfactants, macromolecules and/or phospholipids, are rapidly cleared from the bloodstream due to their capture by the MPS. The results of modified β -CD nanospheres biodistribution in animals showed unambiguously that these particles were rapidly cleared from blood stream [Gèze 2007].

As a result, for an efficient use of non-ionic amphiphilic CD nanoparticles in drug delivery and/or targeting, efforts should be devoted to impart biomimetic properties to these carriers in order to extend their blood circulation time and give them the opportunity to passively accumulate in tissues with increased vascular permeability (tumor, infectious tissue, inflammation sites...). Long-circulating properties were usually obtained by surface decoration of the particles with hydrophilic polymers such as polyethylene glycol (PEG) derivatives, poloxamers, poloxamines or polysaccharides. This concept of surface modification of vectors has been widely applied to various colloidal systems such as liposomes, polymer-based and lipid nanoparticles and has been showed to induce a significant decrease of the opsonisation process and recognition by MPS [Moghimi 2001; 2003a; 2003b; Avgoustakis 2003; Rodriguez 2003; Hoarau 2004; Lemarchand 2004; 2005; Vonarburg 2006a; Béduneau 2006; Morille 2010; Huynk 2010]. These aspects are not yet documented with CD esters colloidal carriers.

To introduce hydrophilic groups such PEG derivatives on the structure of amphiphilic CD nanoparticles, many approaches are conceivable.

The first approach is based on the co-nanoprecipitation of modified CDs and amphiphilic poly-oxyethylene derivatives such as PEG fatty acid esters or conjugated PEG-phospholipids derivatives which could confer long-circulating properties to nanoparticles [Morille 2010]. It is

expected that the co-organization of the two molecular entities yield nanodevices with a mixed CD-lipid core surrounding by a hydrophilic PEG corona, protruding into the aqueous external medium. Besides the hydrophilic coating, the steric polymeric barrier should ensure the stability of nanoparticles in physiological medium.

The second approach may be the grafting of poly-oxyethylene chains on the primary side of CD bioesters. Indeed, the synthesis of well-defined monodisperse amphiphilic CD derivatives that incorporate fatty ester chains at the secondary hydroxyl side and a variety of chemical functionalities (e.g. iodo, bromo, azido, cysteaminyll or isothiocyanato) at the primary hydroxyl side is reported [Hein 2008; Defaye 2008]. The use of this technique to insert PEG chain by exploiting the reactivity of the functional groups can be an alternative. Regarding other amphiphilic CD derivatives, one would think that the nanoparticles made from non-ionic amphiphilic CD grafted with alkyl chains on the primary face and oligo(ethylene glycol) groups on the secondary face could be of great interest in the sense of long-circulating properties. Based on the physicochemical characteristics of these nanoparticles, the others suggest that these particles have a hydrophilic surface coating [Quaglia 2009]. These assumptions have yet to be confirmed by *in vivo* biodistribution assessments.

Indeed, in order to consolidate this concept, the stealth properties of the decorated nanoparticles must be tested. In this objective, the *in vitro* complement activation and macrophages uptake studies may be a first oncoming [Passirani 1998; Vonarbourg 2006b; Morille 2010; Moghimi 2011; Harboe 2011]. Biodistribution studies in animals will complete the *in vitro* results. Imaging technology based on the use of radio-elements or fluorescent markers which prove to be a useful tool for monitoring the biodistribution and *in vivo* behavior of nanoparticles [Gèze 2007; Texier 2009; Dufort 2010] may be considered.

5. Conclusion

The concept of colloidal vectors based on modified CD was admitted for about two decades. Therefore, various complementary and synergistic studies were implemented to consolidate this concept. The researches were nevertheless punctuated by a number of challenges. The building block implemented is not commercial and is synthesized internally in the different research teams. The chemical synthesis initially used, has been an obstacle to the development of those nanocarriers. However, the latch was lifted by the development of a new synthesis method involving an enzyme. This biocatalyse synthesis is simpler, leads to substantial yields of raw material, and is better controlled with regard to the chemical composition of the product. The finer characterization of the product will improve understanding how self-assembly of these derivatives. These non-ionic bioesterified CD derivatives yielded to nanosphere or nanoreservoir-type systems which were characterized

on physicochemical, morphological and structural plans. A variety of morphologies and internal organizations was highlighted with sphere systems. The administration of these colloidal carriers to animal by intravenous route revealed their hepatosplenic tropism and thereby orientate towards functional improvements to be made to confer stealth properties to those vectors. Numerous studies were also undertaken to associate a series of active molecules of interest to these nanosystems. Not only the *in vivo* activity of the nanoparticle-associated drug was evidenced but also the animal tolerance seemed satisfactory. The results of these assessments (*in vitro* and *in vivo* in animals) reinforce the potential of amphiphilic CD carriers as drug delivery systems. However, further work still needed, particularly in the increase of vascular circulation time and especially, *in vivo* biological assessments including nanoparticle distribution, excretion, metabolism, and pharmacodynamics-pharmacokinetics in animal models.

References

- Abdelwahed W., Degobert G., Dubes A., Parrot-Lopez H., Fessi H., Sulfated and non-sulfated amphiphilic β -cyclodextrins: Impact of their structural properties on the physicochemical properties of nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 2008, 351: 289-295.
- Angelova A., Fajolles C., Hocquelet C., Djedaïni-Pilard F., Lesieur S., Bonnet V., Perly B., Lebas G., Mauclair L., Physicochemical investigation of asymmetrical peptidolipidyl-cyclodextrins, *J. Colloid. Interf. Sci.* 2008, 322: 304-314.
- Arnaud O., Boumendjel A., Gèze A., Honorat M., Matera E.L., Guitton J., Stein W.D., Bates S.E., Falson P., Dumontet C., Di Pietro A., Payen L., The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan, *Eur. J. Cancer* 2011, 47: 640-648.
- Auzély-Velty R., Perly B., Taché O., Zemb Th., Dalbiez J.P., Djedaïni-Pilard F., Cholesteryl-cyclodextrins: synthesis and insertion into phospholipid membranes, *Carbohydr. Res.* 1999, 318: 82-90.
- Auzély-Velty R., Djedaïni-Pilard F., Désert S., Perly B., Zemb Th., Micellization of hydrophobically modified cyclodextrins. 1. Micellar structure, *Langmuir* 2000, 16: 3727-3734.
- Auzély-Velty R., Péan C., Djedaïni-Pilard F., Zemb Th., Perly B., Micellization of hydrophobically modified cyclodextrins. 2. Inclusion of guest molecules, *Langmuir* 2001, 17: 504-510.
- Avgoustakis K., Beletsi A., Panagi Z., Klepetsanis P., Livaniou E., Evangelatos G., DS, I., Effect of copolymer composition on the physico-chemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 2003, 259: 115-127.
- Béduneau A., Saulnier P., Anton N., Hindré F., Passirani C., Rajerison H., Noiret N., Benoit J.P., Pegylated Nanocapsules Produced by an Organic Solvent-Free Method: Evaluation of their Stealth Properties, *Pharma. Res.* 2006, 23(9): 2190-2199.
- Bellanger N., Perly B., NMR investigation of the conformation of new cyclodextrin-based amphiphilic transporters for hydrophobic drugs: molecular lollipops, *J. Mol. Struct.* 1992, 273: 215-226.
- Bertino-Ghera B., Perret F., Fenet B., Parrot-Lopez, H., Controle of regioselectivity for new amphiphilic cyclodextrins: Synthesis of di- and tetra(6-deoxy-6-alkylthio) and 6-(perfluoroalkylpropanethio)- α -cyclodextrin derivatives, *J. Org. Chem.* 2008, 73: 7317-7326.
- Bilati U., Allémann E., Doelker E., Nanoprecipitation Versus Emulsion-based Techniques for the Encapsulation of Proteins into Biodegradable Nanoparticles and Process-related Stability Issue, *AAPS Pharm Sci. Tech.* 2005, 6: 594-604.
- Bilensoy E., Nanoparticulate delivery systems based on amphiphilic cyclodextrins, *J. Biomed. Nanotechnol.* 2008a, 4(3): 293-303.
- Bilensoy E., Gurkaynak O., Eratn M., Sen M., Hincal A.A., development of nonsurfactant cyclodextrin nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel, *J. Pharm. Sci.* 2008b, 97(4): 1519-1529.
- Bilensoy E., Gurkaynak O., Dogan A.L., Hincal A.A., Safety and efficacy of amphiphilic beta-cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery, *Int. J. Pharm.* 2008c, 347: 163-170.
- Bilensoy E. and Hincal A.A., Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009, 6(11): 1161-1173.
- Canceill J., Jullien L., Lacombe L., Lehn J.M., Channel-type molecular structures. Part 2. Synthesis of bouquet-shaped molecules based on a β -cyclodextrin core, *Helv. Chim. Acta* 1992, 75(3): 791-812.
- Cannava C., Crupi V., Ficarra P., Guardo M., Majolino D., Mazzaglia A., Stancanelli R., Physicochemical characterization of an amphiphilic cyclodextrin/genistein complex, *J. Pharm. Bio. Anal.* 2010, 51: 1064-1068.
- Choisnard L., Gèze A., Bigan M., Putaux J-L., Wouessidjewe D., Efficient size controlled of amphiphilic cyclodextrin nanoparticles through a statistical mixture design methodology, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2005, 8(3): 593-600.
- Choisnard L., Gèze A., Putaux J.L., Wong Y.S., Wouessidjewe D., Nanoparticles of β -cyclodextrin esters obtained by self-assembling of biotransesterified Cyclodextrins, *Biomacromol.* 2006, 7: 515-520.
- Choisnard L., Gèze A., Yaméogo B.G.J., Putaux J-L., Wouessidjewe D., Miscellaneous nanoaggregates made of β -Cyclodextrins esters synthesised by an enzymatic pathway, *Int. J. Pharm.* 2007, 344: 26-32.

- Choisnard L., Gèze A., Vanharverbeke C., Yaméogo J.B.G., Putaux J-L, Brasme B., Julien L., Boulanger S., Elfakir C., Wouessidjewe D., Physicochemical characterization of α -, β - and γ -cyclodextrins bioesterified with decanoate chains used as building blocks of colloidal nanoparticles, *Biomacromol.* 2011, 12(8): 3031-3038.
- Cirpanli Y., Bilensoy E., Dogan A.L., Calis S., Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, 73: 82-89.
- Cirpanli Y., Allard E., Passirani C., Bilensoy E., Lemaire L., Calis S., Benoit J.P., Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model, *Int. J. Pharm.* 2011, 403: 201-206.
- Cryan S.A., Donohue R., Ravoo B.J., Darcy R., O'Driscoll C.M., Cationic amphiphilic cyclodextrins as gene delivery vectors, *J. Drug Del. Tech.* 2004a, 14(1): 57-62.
- Cryan S.A., Holohan A., Donohue R., Darcy R., O'Driscoll C.M., Cell transfection with polycationic cyclodextrin vectors, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004b, 21: 625-633.
- Davis M.E. and Brewster M.E., Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2004, 3: 1023-1035.
- Defaye J., Balbuena P., Benito J.M., Diaz-Moscoso A., Di Giorgio C., Garcia Fernandez J.M., Gèze A., Gomez-Garcia M., Ortiz-Mellet C., Vierling P., Wouessidjewe D., Preparation of nanosphere amphiphilic cyclodextrin derivatives as biological transporters, *PCT Int. Appl.* 2008, WO 2008009831, WO 2007-FR1259 20070720.
- Diaz-Moscoso A., Balbuena P., Gomez-Garcia M., Ortiz-Mellet C., Benito J.M., Le Gourrière L., Di Giorgio C., Vierling P., Mazzaglia A., Micali N., Defaye J., Garcia Fernández J.M., Rational design of cationic cyclodigosaccharides as efficient gene delivery systems, *Chem. Commun.* 2008, 17: 2001-2003.
- Diakur J., Zuo Z., Wiebe L.I., Synthesis and drug complexation studies with β -cyclodextrins fluorinated on the primary face, *J. Carbohydr. Chem.* 1999, 18(2): 209-223.
- Donohue R., Mazzaglia A., Ravoo B.J., Darcy R., Cationic β -cyclodextrin bilayer vesicles, *Chem. Commun.* 2002, 23: 2864-2865.
- Dubes A., Bouchu D., Lamartine R., Parrot-Lopez H., An efficient regio-specific synthetic route to multiply substituted acyl-sulfated β -cyclodextrins, *Tetrahedron Lett.* 2001, 42: 9147-9151.
- Dubes A., Degobert G., Fessi H., Parrot-Lopez H., Synthesis and characterisation of sulfated amphiphilic α -, β - and γ -cyclodextrins: application to the complexation of acyclovir, *Carbohydr. Res.* 2003, 338: 2185-2193.
- Duchêne D., Ponchel G. Wouessidjewe D., Cyclodextrins in targeting, Application to nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999, 36: 29-40.
- Dufort S., Sancey L., Wenk C., Jossierand V., Coll J., Optical small animal imaging in the drug discovery process. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1798(12): 2266-2273.
- Falvey P., Lim W.C., Darcy R., Revermann T., Karst U., Giesbers M., Marcelis A.T.M., Lazar A., Coleman A.W., Reinhoudt D.N, Ravoo B.J., Bilayer vesicles of amphiphilic cyclodextrins: host membranes that recognize guest molecules, *Chem. Eur. J.* 2005, 11: 1171-1780.
- Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules, French Patent FR 86184444, 1986.
- Fessi, H., Devissaguet, J.P., Thies C., Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanospheres, US Patent 5,118,529, 1988.
- Frank D.W., Gray J.E, Weaver R.N., Cyclodextrin nephrosis in the rat, *Am. J. Pathol.* 1976, 83: 367-382
- Gallois-Montbrun D., Thiebault N., Moreau V., Lebas G., Archambault J.C., Lesieur S., Djedaïni-Pilard F., Direct synthesis of novel amphiphilic cyclodextrin, *J. Incl. Phenom. Macrocycl.* 2007, 57: 131-135.
- Gèze A., Aous S., Baussanne I., Putaux J-L., Defaye J., Wouessidjewe D., Influence of chemical structure of amphiphilic β -cyclodextrins on their ability to form stable nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 2002, 242: 301-305.
- Gèze A., Putaux J-L., Choisnard L., Jehan P., Wouessidjewe D., Long-term shelf stability of amphiphilic beta-cyclodextrin nanosphere suspensions monitored by dynamic light scattering and cryo-transmission electron microscopy, *J. Microencapsul.* 2004, 21(6): 607-613.
- Gèze A., Tieu Chau L., Choisnard L., Mathieu J.P., Marti-Battle D., Riou L., Putaux J-L., Wouessidjewe D., Biodistribution of intravenously administrated amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres, *Int. J. Pharm.* 2007, 344(1-2): 135-142.

- Gèze A., Choisnard L., Putaux J-L., Wouessidjewe D., Colloidal systems made of biotransesterified cyclodextrins grafted with C10 alkyl chains, *Mater. Science Eng. C* 2009, 29: 458-462.
- Goutayer M., Dufort S., Josserand V., Royère A., Heinrich E., Vinet F., Bibette J., Coll J.L., Texier I., Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by *in vivo* fluorescence imaging, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 75(2): 137-147.
- Granger C.E., Felix C.P., Parrot-Lopez H.P., Langlois B.R., Fluorine containing β -cyclodextrin: a new class of amphiphilic carriers, *Tetrahedron Lett.* 2000, 41: 9257-9260.
- Gulik A., Delacroix H., Wouessidjewe D., Skiba M., Structural properties of several amphiphilic cyclodextrins and some related nanospheres. An X-ray scattering and freeze fracture electron microscopy study, *Langmuir* 1998, 14: 1050-1057.
- Harboe M., Thorgersen E.B., Mollnes T.E., Advances in assay of complement function and activation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011, 63: 976-987.
- Hein C. D., Lui X-M., Wang D., Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences, *Pharm. Res.* 2008, 25(10): 2216-2230.
- Hoarau D., Delmas P., David S., Roux E., Leroux J., Novel long-circulating lipid nanocapsules, *Pharm. Res.* 2004, 21(10): 1783-1789.
- Huynh N.T., Roger E., Lautram N., Benoit J.P., Passirani C., The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: passive versus active targeting, *Nanomedicine* 2010, 5(9): 1415-1433.
- Kawabata Y., Matsumoto M., Tanaka M., Takahashi H., Irinatsu Y., Tamara S., Tagaki W., Nakahara H., Fukuda K., Formation and deposition of monolayers of amphiphilic β -cyclodextrin derivatives, *Chem. Lett.* 1986, 11: 1933-1934.
- Kieken F., West C., Keddadouche K., Elfakir C., Choisnard L., Geze A., Wouessidjewe D., Characterization of complex amphiphilic cyclodextrin mixtures by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2008, 1189: 385-391.
- Kraus T., Budesinsky M., Zavada J., General approach to the synthesis of persubstituted hydrophilic and amphiphilic β -cyclodextrin derivatives, *J. Org. Chem.* 2001, 66(13): 4595-4600.
- Lahiani-Skiba M., Bounoure F., Shawky-Tous S., Arnaud P., Skiba M., Optimization of entrapment of metronidazole in amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres, *J. Pharm. Bio. Anal.* 2006, 41: 1017-1021.
- Leemhuis H., Kelly R.M., Dijkhuizen L., Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 85: 823-835.
- Lemarchand C., Gref R., Couvreur P., Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, 58: 327-341.
- Lemarchand, C., Gref, R., Lesieur S., Hommel H., Vacher B., Besheer A., Maeder K., Couvreur P., Physico-chemical characterization of polysaccharide-coated nanoparticles, *J. Control Release* 2005, 108: 97-111.
- Lemos-Senna E., Lesieur S., Wouessidjewe D., Duchêne D., Progesterone-loaded in modified cyclodextrin nanoparticles: evaluation of the physical state of the drug, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1996, 42(suppl.): 34S.
- Lemos-Senna E., Wouessidjewe D., Lesieur S., Duchêne D., Preparation of amphiphilic cyclodextrin nanospheres using the emulsion solvent evaporation method, influence of the surfactant on preparation and hydrophobic drug loading, *Int. J. Pharm.* 1998a, 170: 119-128.
- Lemos-Senna E., Wouessidjewe D., Duchêne D., Lesieur S., Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles: particle solubilization and reconstitution by the action of a non-ionic detergent, *Col. Surf. B: Biointerfaces* 1998b, 10: 291-301.
- Leroy-Lechat F., Wouessidjewe D., Puisieux F., Duchêne D., Optimization of entrapment of doxorubicin in nanospheres of modified β -cyclodextrin, *Ed. Santé Paris* 1994, 463-466.
- Lesieur S., Charon D., Lesieur P., Ringard-Lefebvre C., Muguet V., Duchêne D., Wouessidjewe D., Phase behavior of fully hydrated DMPC-amphiphilic cyclodextrin systems, *Chem. Phys. Lipids* 2000, 106: 127-144.
- Lin J., Creminon C., Perly B., Djedaïni-Pilard F., New amphiphilic derivatives of cyclodextrins for the purpose of insertion in biological membranes: the "cup and ball" molecules, *J. Chem. Soc. Chem. Perkin Trans.* 1998, 2: 2639-2646.

- Lombardo D., Longo A., Darcy R., Mazzaglia A., Structural properties of non-ionic cyclodextrin colloids in water, *Langmuir* 2004, 20(4): 1057-1064.
- Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control Release* 2000, 65(1-2): 271-284.
- Matsumura Y., Maeda H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Res.* 1986, 46: 6387-6392.
- Mazzaglia A., Valerio A., Villari V., Rencurosi A., Lay L., Spadaro S., Micali N., Probing specific protein recognition by size-controlled glycosylated cyclodextrin nanoassemblies, *New J. Chem.* 2006, 30(11): 1662-1668.
- McNicholas S., Rencurosi A., Lay L., Mazzaglia A., Sturiale L., Perez M., Darcy R., amphiphilic N-Glycosylthiocarbamoyl cyclodextrins: synthesis, self-assembly and fluorimetry recognition by Lens culinaris lectin, *Biomacromol.* 2007, 8: 1851-1857.
- Memisoglu E., Bochot A., Sen M., Charon D., Duchêne D., Hincal A.A., Amphiphilic β -Cyclodextrins modified on primary face: Synthesis, characterization and evaluation of their potential as novel excipients in the preparation of nanocapsules, *J. Pharm. Sci.* 2002, 91(5): 1214-1224.
- Memisoglu E., Bochot A., Ozalp M., Sen M., Duchêne D., Hincal A.A., Direct formation of nanospheres from amphiphilic β -Cyclodextrin inclusion complex, *Pharm. Res.* 2003a, 20(1): 117-125.
- Memisoglu E., Bochot A., Sen M., Duchêne D., Hincal A.A., Non-surfactant nanospheres of progesterone inclusion complex with amphiphilic β -Cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* 2003b, 251: 143-153.
- Memisoglu-Bilensoy E., Vural I., Bochot A., Renoir J.M., Duchêne D., Hincal A.A., Tamoxifen citrate loaded amphiphilic β -Cyclodextrin nanoparticles: In vitro characterization and cytotoxicity, *J. Control Release* 2005, 347: 489-496.
- Memisoglu-Bilensoy E., Sen M., Hincal A.A., Effect of drug physicochemical properties on *in vitro* characteristics of amphiphilic cyclodextrin nanospheres and nanocapsules, *J. Microencapsul.* 2006a, 23(1): 59-68.
- Memisoglu E., Hincal A.A., Sterile injectable cyclodextrin nanoparticles: effects of gamma irradiation and autoclaving, *Int. J. Pharm.* 2006b, 311: 203-208.
- Memisoglu-Bilensoy E., Dogan A.L., Hincal A.A., Cytotoxic evaluation of injectable cyclodextrin nanoparticles, *J. Pharm. Pharmacol.* 2006c, 58: 585-589.
- Micali N., Villarir V., Mazzaglia A., Monsu Scolaro L., Valerio A., Rencurosi A., Lay L., Cyclodextrin nanoaggregates and their assembly with protein: a spectroscopic investigation, *Nanotechnology* 2006, 17: 3239-3244.
- Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C., Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory and practice, *Pharmacol. Rev.* 2001, 53: 283-318.
- Moghimi S.M., Szebeni J., Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties, *Progress Lipid Res.* 2003a, 42: 463-478.
- Moghimi S. M., Pavey K., Hunter A.C., Real-time evidence of surface modification at polystyrene lattices by poloxamine 908 in the presence of serum: *in vivo* conversion of macrophage-prone nanoparticles to stealth entities by poloxamine 908, *FEBS Letters* 2003b, 547: 177-182.
- Moghimi S.M., Andersen A.J., Ahmadvand D., Wibroe P.P., Andersen T.L., Hunter A.C., Material properties in complement activation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011, 63: 1000-1007.
- Morille M., Montier T., Legras P., Carmoy N., Brodin P., Pitard B., Benoît J.P., Passirani C., Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting, *Biomaterials* 2010, 31(2): 321-329.
- Moutard S., Perly B., Gode P., Demaillly G., Djedaïni-Pilard F., Novel glycolipids based on cyclodextrins, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2002, 44 : 317-322.
- Ortiz-Mellet C., García Fernández J.M., Benito J.M., Cyclodextrins-based gene delivery systems, *Chem. Soc. Rev.* 2010.
- Parrot-Lopez H., Perret F., Bertino-Ghera B., Amphiphilic cyclodextrins and their applications. Preparation of nanoparticles based on amphiphilic cyclodextrins for biomedical application, *Ann. Pharm. Fr.* 2010, 68: 12-26.

- Passirani C., Barrat G., Devissaguet J.P., Labarre D., Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system, *life sciences*, 1998, 62(8): 775-785.
- Pedersen N.R., Kristensen J.B., Bauw G., Ravoo J., Darcy R., Larsen K.L., Pedersen L.H., Thermolysin catalyzes the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO, *Tetrahedron: Asymmetry* 2005, 16(3): 615-622.
- Perez-Victoria I., Morales J.C., Regioselectivity in acylation of oligosaccharides catalysed by the metalloprotease thermolysin, *Tetrahedron* 2006, 62 2361-2369. Rajeswari C., Alka A., Javed A., Khar R.K., Cyclodextrins in drug delivery: an updated review, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2005, 6(2): 329-357.
- Peroche S., Parrot-Lopez H., Novel fluorinated amphiphilic cyclodextrin derivatives: Synthesis of mono-, di- and heptakis-(6-deoxy-6-perfluoroalkylthio)- β -cyclodextrins, *Tetrahedron Lett.* 2002, 44(2): 241-245.
- Quaglia F., Ostacolo L., Mazzaglia A., Villari V., Zaccaria D., Sciortino M., The intracellular effects of non-ionic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles in the delivery of anticancer drug, *Biomaterials* 2009, 30: 374-382.
- Ravoo B.J., Darcy R., Cyclodextrin bilayer vesicles, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39(23): 4324-4326.
- Rodriguez J., Santos-Magalhaes N., Coelho L., Couvreur P., Ponchel G., Gref R., Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *J. Control Release* 2003, 92: 103-112.
- Roux M., Perly B., Djedaïni-Pilard F., Self-assemblies of amphiphilic cyclodextrins, *Eur. Biophys. J.* 2007, 36: 861-867.
- Salameh A., Lazar A.N., Coleman A.W., Parrot-Lopez H., Synthesis and interfacial properties of amphiphilic β -cyclodextrins and their substitution at the O-6 position with a mono bio-recognizable galactosyl antenna, *Tetrahedron* 2005, 61(36): 8740-8745.
- Sallas F., Darcy R., Amphiphilic cyclodextrins - Advanced in synthesis and supramolecular chemistry, *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 957-969.
- Shimpi S., Chauhan B., Shimpi P., Cyclodextrins: application in different routes of drug administration, *Acta. Pharm.* 2005, 55: 139-156.
- Skiba M., Wouessidjewe D., Coleman A.W., Fessi H., Devissaguet J.P., Duchêne D., Puisieux F., Préparation et utilisations de nouveaux systèmes colloïdaux dispersibles à base de cyclodextrines sous forme de nanosphères, French Patent 92 07287, 1992a.
- Skiba M., Wouessidjewe D., Fessi H., Devissaguet J.P., Duchêne D., Puisieux F., Préparation et applications de nouveaux systèmes colloïdaux nanovésiculaires dispersibles à base de cyclodextrines, sous forme de nanocapsules, French Patent 92 07285, 1992b.
- Skiba M., Morvan C., Duchêne D., Puisieux F., Wouessidjewe D., Evaluation of gastrointestinal behaviour in the rat of amphiphilic β -cyclodextrin nanocapsules, loaded with indometacin. *Int. J. Pharm.* 1995, 126: 275-279.
- Skiba M., Wouessidjewe D., Puisieux F., Duchêne D., Gulik A., Characterisation of amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres, *Int. J. Pharm.* 1996a, 142 : 121-124.
- Skiba M., Nemati F., Puisieux F., Duchêne D., Wouessidjewe D., Spontaneous formation of drug-containing amphiphilic β -cyclodextrin nanocapsules, *Int. J. Pharm.* 1996b, 126: 241-245.
- Skiba M., Skiba-Lahiani M., Arnaud P., Design of nanocapsules based on novel fluorophilic cyclodextrin derivatives and their potential role in oxygen delivery, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2002, 44(1-4): 151-154.
- Soares A., Gèze A., Choïnard L., Ribouot C., Faure P., Carvalho R.A., Jones J.G., Veiga F.V., Wouessidjewe D., Enhancement of insulin's action by PLGA-Cyclodextrin esters nanoparticles, *Proc. 17th International Conference on Bioencapsulation, Groningen, Netherland* 2009.
- Stancanelli R., Guardo M., Cannava C., Guglielmo G., Ficarra P., Villari V., Micali N., Mazzaglia A., Amphiphilic cyclodextrins as nanocarriers of Genistein: a spectroscopic investigation pointing out the structural properties of the host/Drug Complex System, *J. Pharm. Sci.* 2010, 99(7): 3141-3149.
- Texier I., Goutayer M., Da Silva A., Guyon L., Djaker N., Josserand V., Neumann E., Bibette J., Vinet F. Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved *in vivo* fluorescence imaging, *J. Biomed. Optics*. 2009, 14(5): 054005, 1-11.

Tchoreloff P., Boissonnade M.M., Coleman A.W., Bazskin A., Amphiphilic monolayers of insoluble cyclodextrins at the water/air interface. Surface pressure and surface potential studies, *Langmuir* 1995, 11: 191-196

Thioune O., Fessi H., Devissaguet J.P., Puisieux F., Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant, *Int. J. Pharm.* 1997, 146: 233-238.

Vauthier C., Schmidt C., Couvreur P., Measurement of the density of polymeric nanoparticulate drug carriers by isopycnic centrifugation, *J. Nanopart. Res.* 1999, 1: 411-418.

Vauthier C., Bouchemal K., Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles, *Pharm. Res.* 2009, 26(5): 1025-1058.

Vonarbourg A., Passirani C., Saulnier P., Benoit J.P., Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials* 2006a, 27(24): 4356-4373.

Vonarbourg A., Passirani C., Saulnier P., Simard P., Leroux J., Benoit J.P., Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake, *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006b, 78(3): 620-628.

Wenz G., Synthesis and characterization of some lipophilic per(2,6-di-O-alkyl) cyclomalto-oligosaccharides, *Carbohydr. Res.* 1991, 214: 257-265.

Zhang P., Ling C.C., Coleman A.W., Parrot-Lopez H., Galons H., Formation of amphiphilic cyclodextrins via hydrophobic esterification at the secondary hydroxyl face, *Tetrahedron Lett.* 1991, 32(24): 2769-2770.

PUBLICATIONS DES RESULTATS

Publication de résultats N° 1**Etude de l'association de l'Artémisinine aux nanoparticules de cyclodextrines bioestérifiées**

Cette partie de notre travail a consisté à développer des formulations de suspensions colloïdales (nanosphères et nanoréservoirs) à base de CDs bioestérifiées chargées en ART.

Dans le cas de la formulation de nanosphères, une première étude de screening menée avec la β -CD-C₁₀ et la γ -CD-C₁₀ a montré que la prise en charge de l'ART était plus élevée avec le dérivé gamma. Par la suite, les conditions opératoires de nanoprécipitation en présence de γ -CD-C₁₀ et d'ART ont été ajustées et optimisées. Nous avons mis en évidence l'existence d'un rapport molaire ART/ γ -CD-C₁₀ ($r = 1/1$), compatible avec la formulation de suspensions colloïdales stables sur une période de plus d'un mois, malgré l'absence de tensioactif. La possibilité de prise en charge de l'ART par des systèmes nanoréservoirs à base de γ -CD-C₁₀, stabilisés par le couple d'agents tensioactifs Montane 80/ Montanox 80, a également été envisagée. Ces travaux de formulation ont permis d'obtenir des nanosystèmes de type sphère ou réservoir, monodisperses en tailles (70 et 220 nm, respectivement) et présentant des taux de recouvrement en ART de l'ordre de 95 %.

Nous avons ensuite examiné la possibilité d'obtenir des nanoparticules de γ -CD-C₁₀ décorées en surface par co-nano-assemblage de la γ -CD-C₁₀ avec des dérivés amphiphiles de polyéthylène glycol (PEG). Les résultats montrent que les deux dérivés amphiphiles se co-organisent sous la forme de suspensions colloïdales. L'ancrage de l'amphiphile PEGylé au sein de la nanostructure est favorisé par les interactions entre les portions aliphatiques de chaque constituant. La couronne hydrophile en surface confère une bonne stabilité physique aux nanosystèmes formulés.

Les essais de libération réalisés *in vitro* indiquent que l'ART associée est libérée des nanosystèmes pendant une période de 96 heures pour les nanoréservoirs et de 240 heures pour les nanosphères. Enfin, l'évaluation de l'activité anti-plasmodiale *in vitro* grâce au test de *p*-lactate deshydrogénase a montré que les suspensions colloïdales chargées d'ART sont actives sur des souches chloroquino-résistante (K1) et chloroquino-sensible (3D7) de *P. falciparum*. Les concentrations inhibitrices 50 % (CI₅₀) obtenues, de l'ordre de 3 à 6 ng.mL⁻¹, sont tout à fait comparables à celles de l'ART solubilisée en solvant organique, déterminée dans les mêmes conditions (3 à 5 ng.mL⁻¹).

**Article publié,
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 80 (2012) 508-517.**



Research paper

Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers – I: Formulation, lyoavailability and *in vitro* antimalarial activity assessment

Josias B.G. Yaméogo^{a,c}, Annabelle Gèze^{a,*}, Luc Choisnard^a, Jean-Luc Putaux^b, Adama Gansané^d, Sodiomon B. Sirima^d, Rasmané Semdé^c, Denis Wouessidjewe^a

^a DPM, UMR CNRS 5063, ICMG FR 2607, Faculty of Pharmacy, University of Grenoble, France

^b CERMAV, UPR CNRS 5301, ICMG FR 2607, Grenoble, France

^c UFR/SDS, University of Ouagadougou, Burkina Faso

^d Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP), Burkina Faso

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2011

Accepted in revised form 19 December 2011

Available online 30 December 2011

Keywords:

Amphiphilic cyclodextrins

Nanocarriers

Artemisinin

Malaria

Plasmodium falciparum

Cryo-TEM

ABSTRACT

We recently reported a one-step transesterification of cyclodextrins (CDs) by vinyl-acyl fatty esters catalyzed by thermolysin. By using the solvent displacement method and depending on the experimental conditions, the CD derivatives grafted with decanoic alkyl chains (CD-C₁₀) yielded either nanosphere or nanoreservoir-type systems with a size ranging from 70 to 220 nm. Both types of nanostructures were able to associate artemisinin (ART), a well-known antimalarial lipophilic drug. The formulation parameters were optimized to reach stable and high ART dosage corresponding to drug levels of 0.3 and 1.6 mg mL⁻¹ in the colloidal suspension, for the spherical and reservoir-type nanosystems, respectively. PEG surface-decorated nanoparticles were also prepared by co-nanoprecipitation of PEG fatty acid esters and CD-C₁₀ molecules. The integration of the PEGylated amphiphiles within the CD-C₁₀ nanostructures did not influence the ART lyoavailability. Both types of ART-loaded nanosystems showed a sustained *in vitro* release profile over 96 (nanoreservoirs) and 240 h (nanospheres). Finally, the *in vitro* antimalarial activity was evaluated using the lactate dehydrogenase assay. ART-containing colloidal suspensions inhibited the growth of cultured *Plasmodium falciparum*, both multi-resistant K1 and susceptible 3D7 strains with IC₅₀ values (2.8 and 7.0 ng mL⁻¹) close to those of reference ART solution. These colloidal nanosystems based on CD derivatives and containing ART may provide a promising alternative formulation for injectable use of ART.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Malaria is a major public health problem in several tropical countries causing about 500 million clinical cases and 3 million deaths each year, essentially children and pregnant women. The severe and complicated stages have a mortality rate between 20% and 50%. The *Plasmodium falciparum* parasite is responsible for the most serious form of the disease, resulting in rapid deterioration of the patient condition together with the development of a number of life-threatening complications [1]. To face the resistance of *P. falciparum* against usual drugs like chloroquine, the challenge lies in finding alternative therapies, especially for high-risk groups.

Artemisinin (ART), an endoperoxide sesquiterpene lactone antimalarial drug (Fig. 1) isolated from a Chinese medicinal herb (*Artemisia annua*), has a fast action against chloroquine-sensitive

and chloroquine-resistant strains of *P. falciparum*, making it very effective in the treatment of multidrug-resistant malaria. However, its poor aqueous solubility, short half-life, and high first-pass metabolism limit its use in therapeutics [2,3]. Many studies were carried out with the aim of enhancing ART solubility and/or bioavailability. Among these investigations, Wong et al. demonstrated that ART solubility, dissolution and oral bioavailability could be increased through inclusion complexes with β- and γ-cyclodextrins (CDs) [4,5]. The spray-drying of ART with maltodextrins has also been successfully tested to enhance the aqueous solubility of ART [6]. The use of lipid nanocarriers such as liposomes and nanocapsules to improve delivery of antimalarial compounds such as the lipophilic ART derivative artemether, chloroquine, and halofantrine has also been established [7–10].

Recently, we successfully synthesized α-, β-, and γ-CD fatty esters grafted on the secondary face with C₄ to C₁₄ aliphatic chains, by a one-step transesterification using thermolysin as biocatalyzer and vinyl-acyl esters as alkyl chains donor [11,12]. These CD derivatives have been shown to self-assemble and form stable supramolecular matrix-type or reservoir-type particles in the conditions of

* Corresponding author. DPM, UMR CNRS 5063, ICMG FR 2607, Faculty of Pharmacy, University of Grenoble, France. Tel.: +33 476635301; fax: +33 476635322.

E-mail address: annabelle.geze@ujf-grenoble.fr (A. Gèze).

nanoprecipitation [11–13]. Some of these derivatives formed original multilayered nanostructures, foreshadowing different drug localizations in the nanostructure [11].

The purpose of the present study was to investigate the potential of the latest self-assembled bio-transesterified CD-based nanocarriers as ART delivery systems for an intravenous route. The rationale behind the use of these nanodevices is related to their size and their ability to associate lipophilic drugs [13,14]. The objective of our study was twofold: (i) to improve the ART dosage through its association with CD esters-based nanocarriers, (ii) to ensure a sufficient blood circulation time of the nanocarriers through their surface decoration, which is a prerequisite to reach infected erythrocytes after systemic administration. This paper reports on the formulation, the physicochemical and morphological characterization and *in vitro* evaluation (release kinetics and anti-malarial activity) of ART-loaded nanoaggregates.

First, we synthesized and characterized fatty acid esters of β - and γ -CD by a biocatalysis method, using the vinyl decanoate as donor of alkyl chain. The ability of these derivatives to self-organize into sub-micronic structures was assessed using the solvent displacement method. In the second part, the effect of some formulation parameters on the ART entrapment by β - or γ -CD- C_{10} based nanospheres was evaluated. The ART incorporation was subsequently extended to the nanoreservoir structures of γ -CD- C_{10} in order to evaluate the interest of both nanovehicles. Third, the integration of PEG esters in the formulation was investigated in order to prepare PEG surface-decorated particles with a prolonged blood circulation time. The last part of this study was devoted to *in vitro* testing of formulations selected on the basis of established criteria, namely the drug incorporation rate and the physicochemical stability.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Thermolysin (EC 3.4.24.27), a protease type \times isolated from *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, anhydrous DMSO (99%), vinyl decanoate (95%), Artemisinin ($C_{15}H_{22}O_5$, 98%, Mw = 282.3 g mol⁻¹), RPMI 1640 medium, Albumax[®] II (Lipid rich bovine serum albumin for cell culture), Gentamicin (for *in vitro* culture), HEPES buffer (pH 7.4), Giemsa solution, Chloroquine diphosphate (98%, Mw = 516 g mol⁻¹), and celite were obtained from Sigma–Aldrich (l'Isle d'Abeau Chesnes, France). Dihydro-Artemisinin and Quinine hydrochloride were purchased from Fluka (Sigma–Aldrich). β - and γ -CD (Kleptose[®]) were provided by Roquette (Lestrem, France). Montane[®] 80 (sorbitan mono-oleate) and Montanox[®] 80 (polysorbate 80, ethoxylated sorbitan mono-oleate) of pharmaceutical grade were kindly provided by Seppic (Castres, France). Miglyol[®] 812 N (caprylic/capric medium chain triglycerides) and poloxamer 188 were obtained from Sasol (Witten, Germany). Benzyl benzoate was supplied by Cooper (Melun, France). Polyethylene glycol (PEG300, PEG400, PEG1500 and PEG4000) esters (dilaurate and stearate) were purchased from Stearinerie DuBois (France). The organic solvents were from VWR International (Lyon, France). *P. falciparum* strains K1 and 3D7 were supplied by London School of Hygiene and Tropical Medicine (London, England). Malstat reagent was made with 0.125% Triton X-100, 130 mM L-lactate, 30 mM Tris buffer, and 0.62 μ M 3-acetylpyridine adenine dinucleotide. NBT/PES solution was made with 1.90 μ M nitro blue tetrazolium and 0.24 μ M phenazine etho-sulfate. Water was freshly deionized in our laboratory.

2.2. Synthesis and characterization of β - and γ -CD- C_{10}

The β - and γ -CD fatty esters were biosynthesized according to the procedure previously reported involving thermolysin as biocat-

alyzer [11,12]. The β - and γ -CD fatty esters were obtained as a white powder and were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy (MALDI-MS).

MALDI-MS data of β -CD- C_{10} : ($m+Na^+$)/ z = 2083.0 (Relative Intensity: 22.0%) [decanoate β -CD ester with 6 chains], 2237.0 (Relative Intensity: 100%) [decanoate β -CD ester with 7 chains], 2391.0 (relative intensity: 22.0%) [decanoate β -CD ester with 8 chains]. MALDI-MS data of γ -CD- C_{10} : ($m+Na^+$)/ z = 2398.0 (relative intensity: 7.2%) [decanoate γ -CD ester with 7 chains], 2552.1 (relative intensity: 100%) [decanoate γ -CD ester with 8 chains], 2706.3 (relative intensity: 87.2%) [decanoate γ -CD ester with 9 chains], 2860.4 (Relative Intensity: 34.4%) [decanoate γ -CD ester with 10 chains], 3014.0 (relative intensity: 7.2%) [decanoate γ -CD ester with 11 chains]. From these results and according to a validated analytical method [15], the products are characterized by an average molar weight and a total degree of substitution (TDS) of 2714 g mol⁻¹ for γ -CD- C_{10} (TDS 9.2) and 2314 g mol⁻¹ for β -CD- C_{10} (TDS 7.6).

2.3. Preparation of colloidal suspensions

2.3.1. Nanospheres

Unloaded nanoparticles were prepared in triplicate using the solvent displacement method [11–13]. The influence of oligosaccharide ring size (β - or γ -) and hydrophilic surfactant (Montanox[®] 80 or poloxamer 188) on the particle physical characteristics was evaluated. ART-loaded nanoparticles were prepared in a similar way by introducing the drug in the acetonic phase. Two types of formulations were first prepared with an initial CD fatty ester concentration in the organic phase of 1 mg mL⁻¹ (FI) or 2 mg mL⁻¹ (FII). In a second study, a modified displacement method was investigated with γ -CD- C_{10} only (Fig. 2). The biosynthesized CD was either co-nanoprecipitated with ART (process 1) or introduced in an aqueous phase containing ART (process 3). In the cases of processes 2 and 4 (multi-step procedure), a second addition of γ -CD- C_{10} was performed on preformed ART-loaded nanospheres.

2.3.2. Nanoreservoir systems

Reservoir-type nanosystems were prepared by injecting an organic phase containing acetone (10 mL), γ -CD- C_{10} , benzyl benzoate, and a lipophilic surfactant, Montane[®] 80, into an aqueous phase containing distilled water (20 mL) added with a hydrophilic surfactant, Montanox[®] 80, under magnetic stirring (500 rpm) at 25 °C. The organic solvent was removed under reduced pressure and the suspension was concentrated until a final aqueous volume corresponding to 50–60% of initial distilled water volume. ART-loaded systems were prepared using an initial drug amount of 20 mg in the organic solution. All preparations (sphere and reservoir colloidal suspensions) were finally rendered isotonic with glucose solution.

2.3.3. PEGylated nanosystems

PEGylated ART-loaded nanosystems (nanospheres and nanoreservoirs) were formulated according to the previous conditions by

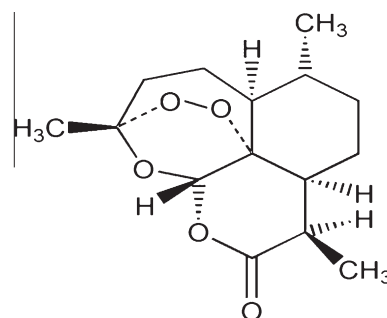


Fig. 1. The chemical structure of Artemisinin (ART).

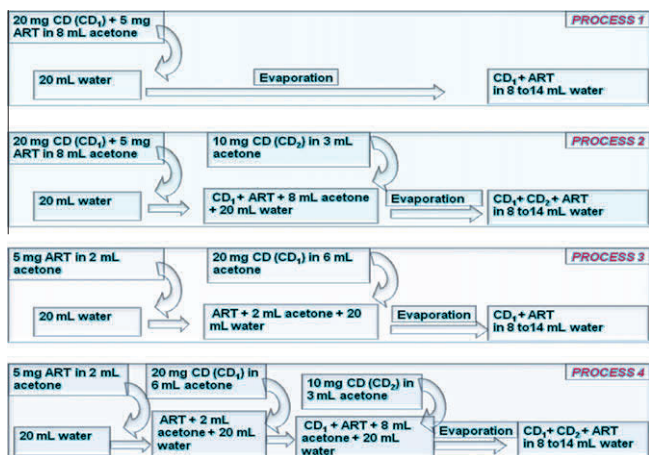


Fig. 2. CD and ART incorporation processes: one-step addition of CD (processes 1 and 3) or multi-step addition of CD (processes 2 and 4). Process 1 = addition of the acetic phase (8 mL) containing CD (20 mg) and ART (5 mg) into the aqueous phase (20 mL deionized water) under stirring; Process 2 = first addition of an acetic phase (8 mL) containing CD (20 mg) and ART (5 mg) in the aqueous phase (20 mL) and then addition of a second acetic CD phase (10 mg in 3 mL); Process 3 = first addition of ART acetic solution (5 mg in 2 mL) in the aqueous phase (20 mL) and then introduction of CD organic phase (20 mg in 6 mL of acetone); Process 4 = first addition of ART acetic solution (5 mg in 2 mL) in the aqueous phase (20 mL) and then introduction of CD acetic phase in two steps, 20 mg in 6 mL, then 10 mg in 3 mL. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

partially or totally substituting the hydrophilic surfactant by polyethylene glycol (PEG) esters. Free PEG ester in the supernatant was removed by gel chromatography. The PEGylated colloidal suspensions were passed through a Sephadex® G-75 columns (dry bead diameter = 40–120 μm , Sigma Aldrich, Sweden).

2.4. Physicochemical characterization of nanosystems

Mean size, polydispersity index (PI), and zeta potential measurements were performed after appropriate dilution by using a Zetasizer 3000 (10 mW HeNe laser at 632.8 nm) [11–13]. The morphology of the nanosystems was observed by transmission electron microscopy (TEM) after negative staining of the preparations with uranyl acetate, using a Philips CM200 ‘Cryo’ microscope operating at 80 kV. The images were recorded on Kodak SO163 films. In addition, the reservoir systems were observed by cryo-TEM on thin vitrified films of the suspensions, according to the procedure described elsewhere [11].

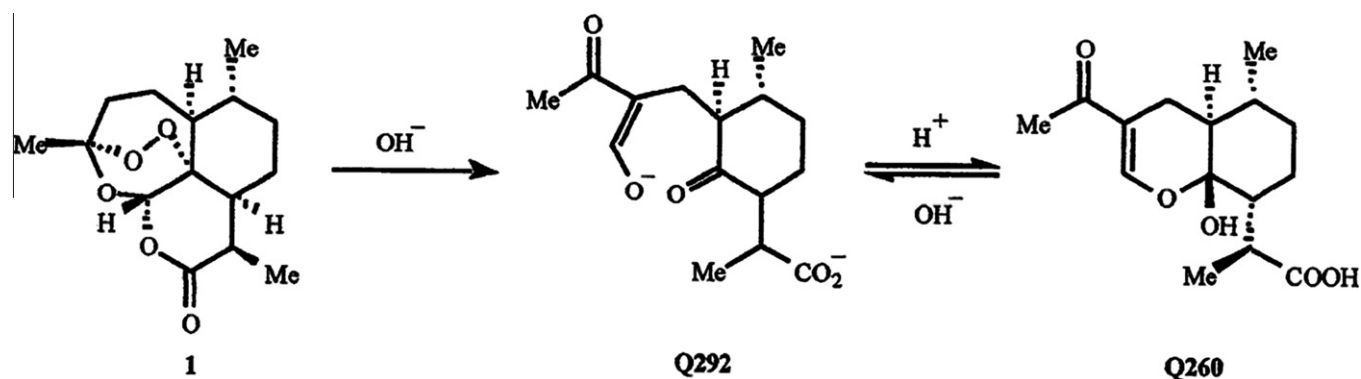


Fig. 3. ART conversion into the ultraviolet (UV) active compound Q260 [16]. ART compounds absorb in the UV region between 210 and 220 nm with poor molar extinction coefficients. Standard UV detection methodology is therefore ineffective in their quantification. The detection of ART has been performed by using pre- or post-column derivatization to convert the drug into a UV active compound that absorbs with a large extinction coefficient at longer wavelengths).

2.5. Determination of drug loading

The amount of drug associated with the nanosystems was assessed as follows: the total concentration of ART recovered in the colloidal suspensions (Ct) was determined using HPLC-UV pre-column derivatization method [16]. The suspension was ultracentrifuged at 250,000 g (OPTIMA™ L-80 XP Beckman Coulter, rotor SW60 Ti) at 20 °C for 2 h (nanoreservoirs) or 1 h (nanospheres) to separate the particles from the supernatant. The ART concentration in supernatant (Cs) was determined by HPLC-UV in the same conditions. The drug recovery DR (%), the drug association DA (%), and the entrapment efficiency EE (%) were estimated as follows:

$$\text{DR (\%)} = (\text{Ct}/\text{Ci}) \times 100 \quad (1)$$

where Ci is the theoretical drug concentration (initially introduced in the formulation).

$$\text{DA (\%)} = (\text{Ct} - \text{Cs})/\text{Ct} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{EE (\%)} = [\text{associated ART (mg)}/\text{Initial CD amount (mg)}] \times 100 \quad (3)$$

An HPLC-UV quantification at 260 nm was carried out at 35 °C with a 1 mL min⁻¹ flow rate according to a validated method ($r^2 = 0.9997$, $y = 35880x - 20,550$) firstly described by Zhao [16]. After a derivatization step by alkaline hydrolysis at 50 °C (Fig. 3) and then neutralization in an acidic medium, the sample was analyzed using a HPLC system constituted by a Varian Prostar pump, a Varian 9050 UV detector, and a Varian Prostar auto-injector model 400. A column Nucleosil 100 C₁₈ (250 × 4.6 mm; 5 μm particle size) from VWR International and a mixture of phosphate buffer (K₂HPO₄ + KH₂PO₄, 0.05 M, pH 6.3) and methanol (55:45, v/v) were used as stationary and mobile phases, respectively.

2.6. Stability study

The suspensions were stored at room temperature during 30 days and their stability was evaluated in terms of appearance, particle size, polydispersity index, and drug recovery [17].

2.7. In vitro release profiles of ART from γ -CD-C₁₀ nanocarriers

The water was kept as release medium. The saturating concentration of ART in the water at 37 °C was experimentally determined at 0.098 mg mL⁻¹. On this basis, all the drug release experiments were performed to ensure that the maximum concentration corresponding to 100% ART release did not exceed 0.065 mg mL⁻¹.

Freshly prepared ART-loaded γ -CD-C₁₀ based colloidal suspensions (nanospheres and nanoreservoirs) were introduced into the release medium (100 or 125 mL of deionized water) under agitation at 50 rpm at 37 °C. At given time intervals, a sample was taken from the medium and ultracentrifuged at 300,000 g (spheres) or 400,000 g (reservoirs), at 20 °C for 1 h. The amount of ART in the supernatant was determined by HPLC coupled to evaporative light scattering detection (ELSD) [18] (Varian Prostar pump; ELSD SEDEX Model 55 Touzart & Matignon, France; 20 μ L sample loop; reversed-phase Kromasil C₁₈ 250 \times 4.6 mm silica column, 5 mm particle size (SUPELCO INC); methanol–water (70:30, v/v) as mobile phase; 1 mL min⁻¹ flow rate; detector temperature set at 32 °C; carrier gas pressure at 2.2 bar; signal gain at 12). The calibration curve ($r^2 = 0.9937$, $y = 1.6569x + 0.8847$) was generated by plotting the logarithm of area under the curve versus the logarithm of concentration. ART-loaded γ -CD-C₁₀ based nanosystems demonstrated a good stability after centrifugation. These conditions allowed to separate particles from the supernatant and ART in the supernatant.

2.8. *In vitro* antimalarial activity of ART-loaded γ -CD-C₁₀ based nanosystems

The *P. falciparum* susceptibility to ART-loaded nanosystems was performed using two parasite strains: a chloroquine-resistant K1 strain and a chloroquine-sensitive 3D7 strain. These two strains were cultured *in vitro* in 25 cm² 3055 corning flasks (USA) with washed erythrocytes (blood of human O rhesus (+) group collected on heparin, obtained from national center of blood transfusion of Burkina Faso and used within 7 days when stored at 4 °C) at a 2% hematocrit in complete culture medium at 37 °C in 5% CO₂, 2% O₂, and 93% N₂ atmosphere. This medium contained RPMI 1640 supplemented with 0.25% Albumax® II, 25 mM NaHCO₃, 50 μ g L⁻¹ gentamicin, and 25 mM HEPES buffer (pH 7.4). The parasitemia was monitored daily by microscopic observation of Giemsa-stained thick blood smears and maintained between 2 and 6% by dilution with non-infected O⁺ erythrocytes if necessary [19,20].

The stock solutions of the tested products (colloidal suspensions and reference antimalarial drugs) were extemporaneously prepared in appropriate solvents at various drug initial concentrations: ART-loaded particles (100 ng mL⁻¹) in complete culture medium, Artemisinin (ART, 49.6 nmol L⁻¹), Dihydro-artemisinin (DHA, 25.6 nmol L⁻¹), and quinine hydrochloride (Q, 800 nmol L⁻¹) in methanol, chloroquine diphosphate (CQ, 1600 nmol L⁻¹) in sterilized distilled water. In the case of lipophilic reference drug stock solutions, less than 1% methanol was present in the final concentration contained, which was found to be non-toxic to the parasite [19,21]. The solutions were distributed on 96-well culture microplates (353072-BD, Falcon®) to obtain serial dilutions with complete culture medium (100 μ L). Parasitized erythrocytes were used as growth control (positive control) and non-parasitized

erythrocytes as negative control. Parasite growth was assessed in duplicate for each serial dilution [20,21] by addition of parasitized blood culture (2% hematocrit and 1.5% parasitemia, 100 μ L) to each well. Incubation was performed at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere during 72 h [21].

The parasite growth in each well was determined by measuring the activity of the *plasmodium*-lactate dehydrogenase (pLDH) according to the method developed by Makler et al. [22]. Briefly, at the end of incubation, the culture was homogenized and an aliquot of 20 μ L was taken and transferred to another 96-well plate. 100 μ L of Malstat reagent and 25 μ L of NBT/PES solution were then added to the medium. The color development in the plate was monitored colorimetrically by optical densities measurement at 650 nm using spectrophotometer plate reader (ELx 808-BioTek). The drug activity, expressed as the concentration of drug that inhibited parasite growth by 50% (IC₅₀), was determined from dose–response curves obtained using Table Curve software 2D v.5.0.

2.9. Statistical analysis

All results were expressed as mean value \pm standard deviation (SD). The ANOVA variance analysis was applied to repeated measurements to compare the characteristics of particles and *in vitro* release data at specific time intervals. The level of significance (*P*) was set at 5%.

3. Results and discussion

3.1. Formulation and characterization of nanospheres

We first investigated the influence of oligosaccharide ring size (β or γ) and initial CD-C₁₀ concentration (FI = 1 mg mL⁻¹ or FII = 2 mg mL⁻¹) on the physicochemical characteristics of the particles, in the conditions of nanoprecipitation. Both β - and γ -CD-C₁₀ fatty esters formed monodisperse supramolecular nanoaggregates with a size of around 100 nm (Table 1), in agreement with previous observations [13]. The ability of CD-C₁₀ nanoaggregates to entrap ART was thus evaluated in the absence of surfactant classically used to stabilize these nanosystems.

The CD concentration in the organic phase did not influence the mean particle size but affected the drug recovery. When ART (5 mg) was introduced in the formulation, the drug loading values expressed in terms of drug recovery (DR), drug association (DA), and entrapment efficiency (EE) were higher for γ -CD-C₁₀ at the initial CD concentration of 2 mg mL⁻¹ in the organic phase (FII). Indeed, the particles exhibited high drug association percentage close to 90% with a total concentration of ART recovered in the suspension of 0.43 mg mL⁻¹. It has to be noted that a slight fraction of ART remained in the aqueous phase corresponding to the experimentally determined ART hydrosolubility at 25 °C (0.064 mg mL⁻¹). A slight

Table 1
Characteristics of unloaded and ART-loaded nanospheres made from β - and γ -CD-C₁₀.

	β -CD-C ₁₀				γ -CD-C ₁₀			
	Unloaded particles		ART-loaded particles		Unloaded particles		ART-loaded particles	
	F I	F II	F I	F II	F I	F II	F I	F II
Mean particle size (nm, $n = 3$)	98 \pm 9	104 \pm 6	103 \pm 6	105 \pm 7	85 \pm 8	88 \pm 5	111 \pm 7	106 \pm 4
Mean PI ($n = 3$)	0.06	0.04	0.05	0.04	0.04	0.09	0.07	0.05
ζ (mV)	-27 \pm 4	-30 \pm 2	-20 \pm 2	-21 \pm 1	-26 \pm 1	-26 \pm 1	-19 \pm 1	-18 \pm 2
Ct (mg mL ⁻¹)	-	-	0.23	0.27	-	-	0.27	0.43
Associated ART = Qt - Qs (mg)	-	-	0.85	1.84	-	-	1.32	3.26
DR (%)	-	-	23.00	46.80	-	-	33.80	72.00
DA (%)	-	-	73.91	78.63	-	-	78.11	90.56
EE (%)	-	-	8.50	9.20	-	-	13.20	16.30

increase in particle mean size and a slight decrease in zeta potential absolute value were observed in the presence of ART suggesting that part of drug molecules was adsorbed on the particle surface.

The high drug EEs of γ -CD- C_{10} particles (13.2 (FI) and 16.3% (FII)) compared to those obtained with β -CD- C_{10} (8.5 (FI) and 9.2% (FII)) may be explained by a specific interaction between ART and the γ -CD-based systems. It is assumed that there are several sites for the drug location within the nanostructures. Indeed, the hypothesis of fixation of the drug to specific sites via hydrophobic bonds has been discussed by Lemos-Senna et al. [23]. It is also quite likely that part of the drug interacts with the cavity of CD- C_{10} , although this hypothesis remains to be confirmed.

The TEM images of negatively stained preparations revealed that the γ -CD- C_{10} nanoparticles (ART-loaded or not) were spherical (Fig. 4d and c, respectively), whereas the corresponding β -CD- C_{10} particles were mostly barrel-shaped (Fig. 4b and a, respectively). This barrel morphology has recently been shown to correspond to a specific hexagonal organization of the β -CD- C_{10} molecules, correlated with the degree of substitution of the derivative [15]. Regarding γ -CD- C_{10} , X-ray diffraction studies are in progress to determine the supramolecular organization and the interaction of ART within the nanostructure.

On the basis of EE results, the systems prepared from γ -CD- C_{10} in the FII conditions (2 mg mL^{-1}) were selected for further experiments.

It is well known that the solvent displacement technique allows to associate significant amounts of drug with a large part that is adsorbed on the surface [23]. Once the formulation realized, a drug desorption from the particles has been observed over time. In order to avoid this loss of drug, we investigated the influence of an additional coating layer of CDs on the preformed particles. The influence of the incorporation mode (one step or two steps) on ART recovery and stability of these formulations were thereby evaluated. As seen in Fig. 5, smaller particles were obtained when drug was co-nanoprecipitated with γ -CDs (processes 1 and 2) without noticeable influence of the overall CD amount introduced (20 and 30 mg, respectively).

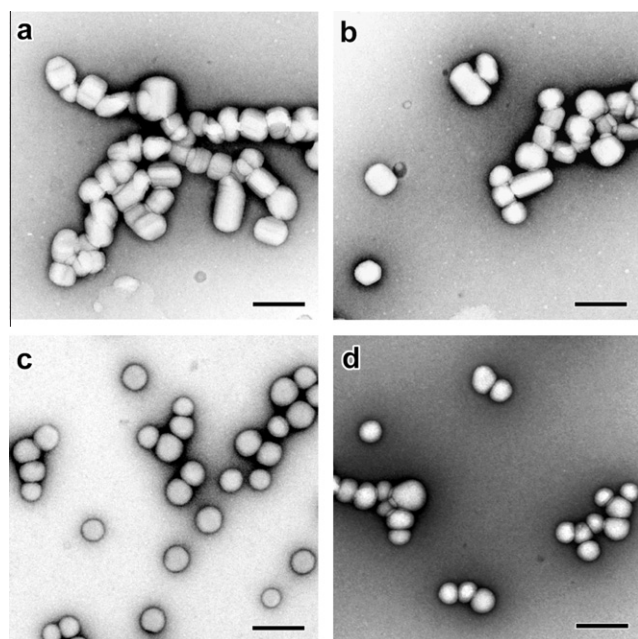


Fig. 4. TEM images of negatively stained particles: (a) β -CD- C_{10} , unloaded; (b) β -CD- C_{10} , ART-loaded; (c) γ -CD- C_{10} , unloaded; (d) γ -CD- C_{10} , ART-loaded. Scale bars: 200 nm.

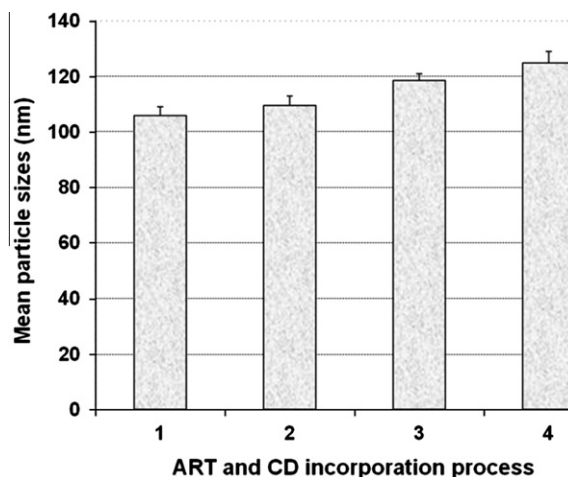


Fig. 5. γ -CD- C_{10} particle size (mean \pm SD) as a function of ART and CD incorporation process.

The nanoparticles prepared by incorporating CD in two steps (20 mg then 10 mg) displayed better initial ART recovery percentages (Fig. 6). Indeed, 84 and 85% DRs were, respectively, obtained in the cases of processes 2 and 4, against 72% and 56% initial DRs for processes 1 and 3. However, whatever the process involved, a loss of drug was observed during the first 14 days, more pronounced in the case of processes 3 and 4, until a stable drug dosage was reached in each type of suspension (Fig. 6). At day 30, total ART amounts of 2.04, 2.70, 1.41, and 2.20 mg were recovered in the suspensions prepared with processes 1, 2, 3, and 4, respectively, corresponding to DRs of 46, 61, 34, and 51%.

This loss may be explained by desorption of part of the drug adsorbed at the surface of particles. When ART-loaded nanospheres were formulated in the conditions of processes 1 and 2 with a lower initial drug amount corresponding to the drug amount remaining at day 14, a high DR (95%) was measured corresponding to ART doses of 0.24 and 0.31 mg mL^{-1} , respectively. These latter formulations were stable over at least 1 month.

It has to be noted that the amount of recovered ART was higher when process 2 (two-step addition of $20 + 10 \text{ mg}$ of CD) was used. To understand this phenomenon, a new formulation was performed by a one-step addition of 30 mg of CD. The corresponding particle characteristics (mean size = 106 nm , PI = 0.10 , Ct = 0.31 mg mL^{-1}) were similar to those obtained with process 2. The high concentration of ART in the suspension obtained with process 2 was related

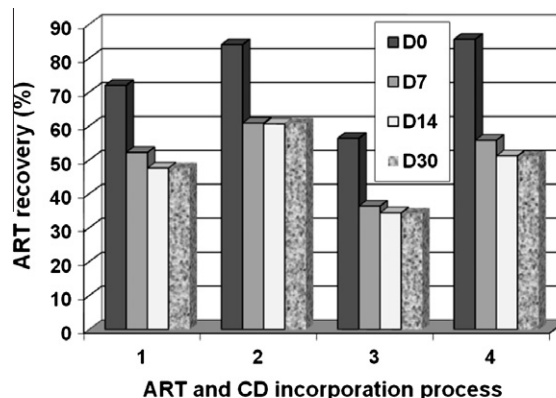


Fig. 6. Drug recovery of loaded γ -CD- C_{10} nanoparticles over 30 days for each process.

to the CD amount introduced. This observation showed that the multi-step introduction of CD did not impact the physicochemical characteristics and stability of particles. Moreover, the results suggest the existence of a drug amount compatible with the formulation of stable nanoparticles. This particular drug amount seems related to the CD material proportion involved in the formulation corresponding to a molar ratio CD/ART of 1:1. Above this equilibrium conditions, an excess drug amount may still be associated with the nanosystem via stacking layers, but non-permanently, thus leading to desorption.

3.2. Formulation and characterization of reservoir-type nanosystems

The high solubility and the good chemical stability (performed at 25 °C and 4 °C for 60 days) at room temperature of ART in benzyl benzoate (BB) (83.30 mg mL⁻¹) compared to medium chain triglycerides (Miglyol 812 N, 23.10 mg mL⁻¹) prompted us to use BB (200 µL) as internal phase of the nanoreservoirs. First, conventional conditions were used to prepare nanoreservoir suspensions involving a low initial CD concentration (2 mg mL⁻¹) and a high lipophilic/hydrophilic surfactant amounts (80 mg/80 mg) [13]. Stable nanoreservoir systems with 190 nm mean particle size were prepared. The amphiphilic molecules (γ -CD-C₁₀ and surfactant) were assumed to form a membrane layer surrounding the lipophilic internal phase. This formulation showed a good ability to associate ART with drug recovery percentage around 92%. The following objective was to optimize the formulation by decreasing the surfactant amount in order to ensure injectable polysorbate concentration within the final suspension [24]. The preparation of optimized suspensions of monodisperse nanoreservoir particles with a size lower than 200 nm presenting a high drug recovery was highly dependent of the proportion of amphiphilic compounds. The screening experiments showed that it was possible to obtain stabilized formulations while lowering the surfactant amount and increasing CD initial concentration (4 mg mL⁻¹). In this condition, the threshold amount of surfactant required for a stable formulation was evaluated at 20 mg. As seen in Table 2, the presence of ART in these formulations did not modify the average particle diameter, suggesting that the drug was mainly localized in the lipophilic core. The zeta potential absolute value did not significantly vary. The amount of entrapped drug was higher than that obtained with nanospheres. The highest drug concentration in the colloidal suspension (1.68 mg mL⁻¹, DR = 94.02%) was obtained in the conditions of formulation C (40 mg γ -CD-C₁₀, 40 mg Montanox[®] 80 and 40 mg Montane[®] 80). Furthermore, the average diameter of reservoir-type particles increased with the amount of BB. Unstable formulations were obtained from 400 µL of BB (data not shown).

Like other nanosystems reported in the literature such as polymeric nanocarriers [25], amphiphilic β -CD nanoparticles [26], lipid nanocapsules [27], the γ -CD-C₁₀ ART-loaded nanoreservoirs stored at room temperature present a good physicochemical stability during at least 1 month.

The TEM images of negatively stained ART-loaded nanoreservoirs (formulation C) suggest that the particles flattened and coalesced during drying (Fig. 7a), as previously reported [13]. Consequently, the size cannot be reliably measured. A population of significantly smaller particles (about 5 nm in diameter) was also observed, likely corresponding to surfactant micelles. To prevent drying artifacts, cryo-TEM images of the quench-frozen suspension were recorded (Fig. 7b). Individual spherical particles were observed, with a diameter typically ranging from 40 to 300 nm. The micelles observed for the negatively stained sample were probably too small to be detected in the cryo-TEM image. If we assume that the ice film has a thickness of 100–150 nm, it is likely that the soft particles with an apparent diameter larger than this value flattened in a direction perpendicular to the film plane, which would shift the size distribution toward higher values. Nevertheless, the apparent size distribution is in agreement with the values determined by dynamic light scattering (DLS).

3.3. Formulation and characterization of PEGylated nanocarriers

Gèze et al. previously demonstrated that nanoparticles made from amphiphilic CDs were rapidly cleared from bloodstream following their systemic administration in mice, resulting from their interactions with mononuclear phagocyte system (MPS), and accumulated in the liver and spleen [28]. It has clearly been demonstrated that nanoparticles with a hydrophilic surface induced a significant decrease in the opsonization process and recognition by MPS and plasma proteins [29–31]. To prepare γ -CD-C₁₀ nanodevices decorated on the surface, we used PEG fatty acid ester. Indeed, PEG is a well-known hydrophilic polymer playing a key role in the prevention against the removal by MPS via a repulsive steric effect [32–34]. The idea of using PEG grafted with alkyl chain (PEG fatty acid ester) is to create an efficient anchoring of amphiphilic PEG in the carrier, via strong hydrophobic interaction between the alkyl chain of PEG ester and the aliphatic part of amphiphilic CD forming the nanosystems.

γ -CD-C₁₀ derivative formulated with low molecular weight PEG (300 or 400 Da) esters (dilaurate, stearate) was unstable in the presence of electrolytes (NaCl 0.09%), as already observed in the case of non-PEGylated nanospheres (results not shown). To the contrary, stable suspensions of nanospheres were obtained with high chain length PEG stearate (1500 and 4000 Da) in presence of NaCl. In the latter case, the size of particles increased with the amount of PEG ester introduced in the formulation. These observations are in good agreement with previous reports claiming that the PEG chain length must exceed 1000 Da for an effective stabilization of nanocarriers [33]. Then, PEGylated nanoreservoir systems were formulated by varying the amount of the following constituents of formulation: γ -CD-C₁₀, Montane[®] 80, Montanox[®] 80 and PEG4000 stearate. The best drug recovery percentage was obtained in the cases of formulations PNR1 (40 mg γ -CD-C₁₀, 40 mg Montane[®] 80 and 15 mg PEG4000 stearate) and formulation PNR2 (20 mg γ -CD-C₁₀, 40 mg Montane[®] 80, 40 mg Montanox[®] 80

Table 2
Unloaded and ART-loaded γ -CD-C₁₀ nanoreservoir characteristics.

	Formulation content (mg)			Unloaded nanoreservoirs			ART-loaded nanoreservoirs				
	γ -CD C ₁₀	Montanox 80	Montane 80	Mean size (nm)	PI	ζ (mV)	Mean size (nm)	PI	ζ (mV)	Ct (mg/mL)	DR (%)
A	20	80	80	190 ± 8	0.08	-24 ± 1	185 ± 6	0.04	-23 ± 1	1.51	91.88
B	20	40	40	180 ± 4	0.04	-27 ± 1	181 ± 7	0.06	-26 ± 1	1.19	84.24
C	40	40	40	176 ± 4	0.05	-30 ± 1	177 ± 6	0.04	-28 ± 1	1.68	94.02
D	40	30	30	177 ± 9	0.07	-29 ± 1	177 ± 8	0.06	-28 ± 1	1.54	92.67
E	40	20	20	179 ± 6	0.05	-30 ± 1	179 ± 4	0.03	-27 ± 1	1.29	85.13
F	40	20	10	177 ± 9	0.06	-	Unstable formulation was obtained				

Volume of BB = 200 µL.

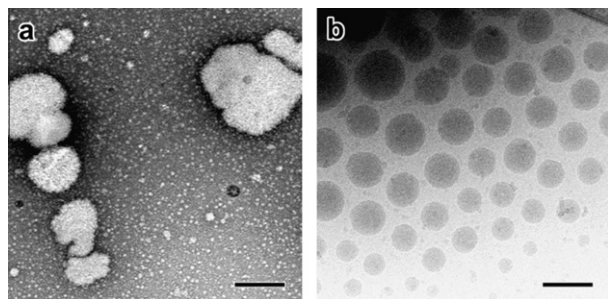


Fig. 7. TEM images of ART-loaded γ -CD-C₁₀ nanoreservoir systems: (a) negative staining; (b) cryo-TEM. Scale bars: 200 nm.

and 15 mg PEG4000 stearate). The particle characteristics for each formulation are summarized in Table 3. The CD/PEG ester ratio used was 4:1 and 8:3 (w/w) for nanosphere and nanoreservoir suspensions, respectively.

In agreement with previous studies [34], the introduction of PEG4000 stearate induced a weak increase in the average diameter of particles and a decrease in the potential zeta absolute value of sphere nanosystems from -26 to -13 and from -18 to -10 for unloaded and ART-loaded nanospheres, respectively, prepared by using process 1 (Tables 1 and 3). These results suggest the presence of PEG moieties at the surface of the particles, creating a steric barrier against flocculation in an electrolyte rich medium. The PEGylation was also applied to the derivative β -CD-C₁₀, in presence of PEG4000 stearate, leading to the same observations.

In comparison with the optimized ART-loaded nanosphere formulated without any stabilizing agent, the amount of ART recovered with γ -CD-C₁₀ PEGylated particles increased from 0.24 to 0.34 mg mL⁻¹ and from 0.31 to 0.47 mg mL⁻¹ in the conditions of processes 1 and 2, respectively. As demonstrated in a previous study [13], the presence of stabilizer such as polyoxyethylated derivatives improved the association by promoting contact between the drug and the hydrophobic particle surface. As can be seen in the TEM images of negatively stained preparations, PEGylated particles (ART-loaded or not) are faceted, although the average size did not significantly change (Fig. 8).

The effect was not clearly detected on the particles prepared from β -CD-C₁₀ derivative (Fig. 8a and b, respectively) as their barrel shape was preserved. The faceting of γ -CD-C₁₀ particles may be due to the organization of PEG chains that, depending on their density on the surface of the particles, would form a more or less contiguous rigid layer (Fig. 8c and d).

The introduction of PEG esters species in the formulation did not modify the ability to entrap ART. Indeed, the DR value was higher than 90%. It has to be noted that PEG4000 stearate nanoparticles showed good stability in terms of size distribution and amount of associated drug after a 30-day storage at room

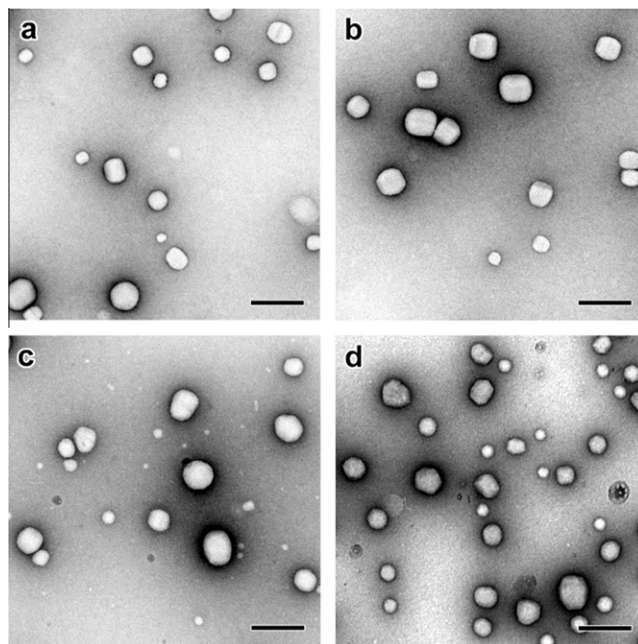


Fig. 8. TEM images of negatively stained PEGylated (PEG 4000 stearate) nanospheres: (a) β -CD-C₁₀, unloaded; (b) β -CD-C₁₀, ART-loaded; (c) γ -CD-C₁₀, unloaded; (d) γ -CD-C₁₀, ART-loaded. Scale bars: 200 nm.

temperature (data not shown). The TEM images of negatively stained PEGylated nanoreservoirs show a polydisperse distribution of particles. However, the flattening and coalescence are less marked than in the case of non-PEGylated γ -CD-C₁₀ reservoirs suggesting that PEG rigidified the surface of the soft particle (Fig. 9a). The cryo-TEM images of the ice-embedded PEGylated ART-loaded nanoreservoirs confirmed the polydispersity of the particles (Fig. 9b), with a size ranging from 40 to 400 nm. Again, the larger particles likely flattened in the ice film which shifts the size distribution toward higher values.

Schematic representations of the γ -CD-C₁₀ nanosystems were drawn based on these results (Fig. 10). In the case of nanospheres, the γ -CD-C₁₀ molecules form a dense structure whose supramolecular organization has not been elucidated yet. The host drug molecule can be located in different regions of the nanostructure, namely adsorbed on the surface and/or entrapped within the core. Drug interaction with the CD cavity may also be possible, via interaction with the primary face of the γ -CD that is less hindered than the secondary face. Indeed, γ -CD complexes at a CD:ART molar ratio of 1:1 were described by Wong and Yuen [5]. In the case of PEGylated nanospheres, the stearate chains of the PEG fatty acid ester are thought to strongly interact with the internal structure

Table 3
Characteristics of PEGylated (PEG4000 stearate) nanosystems.

Formulations	Mean size (nm)	PI	ζ (mV)	Ct (mg/mL)	DR (%)	DA (%)
<i>Unloaded nanosystems stabilized by PEG4000 stearate</i>						
PNS (process 1)	105 ± 4	0.07	-13 ± 1	-	-	-
PNS (process 2)	107 ± 5	0.07	-13 ± 2	-	-	-
PNR1	203 ± 8	0.04	-16 ± 2	-	-	-
PNR2	190 ± 4	0.03	-19 ± 1	-	-	-
<i>ART-loaded nanosystems stabilized by PEG4000 stearate</i>						
PNS (process 1)	113 ± 6	0.05	-10 ± 1	0.34	79.33	87.40
PNS (process 2)	115 ± 8	0.07	-9 ± 2	0.47	80.41	88.00
PNR1	205 ± 7	0.09	-23 ± 3	1.52	92.04	96.33
PNR2	191 ± 9	0.08	-23 ± 2	1.49	91.88	95.25

PNS = PEGylated nanospheres, PNR = PEGylated nanoreservoirs.

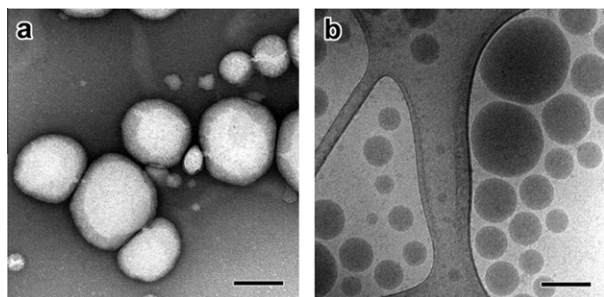


Fig. 9. TEM images of PEGylated (PEG4000 stearate) ART-loaded γ -CD- C_{10} nanoreservoirs: (a) negative staining; (b) cryo-TEM. Scale bars: 200 nm.

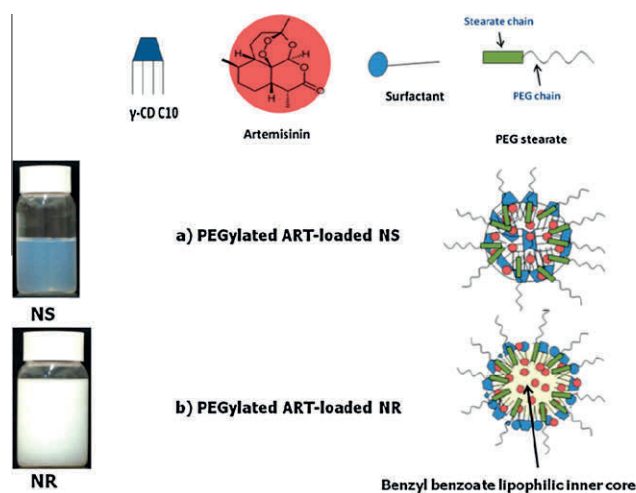


Fig. 10. Photographic images of colloidal suspensions (NS = nanosphere, NR = nanoreservoir) and schematic representation of PEGylated ART-loaded nanosphere (a) and PEGylated ART-loaded nanoreservoir (b). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

of amphiphilic CD, whereas polyoxyethylene portions protrude out in the aqueous phase (Fig. 10a).

The nanoreservoir systems are constituted by a lipophilic core corresponding to the BB solution of ART that is surrounded by the shell of amphiphilic molecules (γ -CD- C_{10} , Montane[®] 80, Montanox[®] 80, PEG stearate). The aliphatic part of the amphiphilic molecules is considered to be anchored in the BB phase, while the hydrophilic part is located in the aqueous solution (Fig. 10b). Moreover, a part of the drug can be attached to the shell of the nanoreservoirs or adsorbed on their surface.

3.4. *In vitro* release

In vitro release assessment was performed on six ART-loaded γ -CD- C_{10} nanoparticulate formulations: γ -CD- C_{10} nanospheres made by processes 1 and 2 without any surfactant (NS-ART), PEG4000 stearate/ γ -CD- C_{10} nanospheres made by processes 1 and 2 (PEGylated NS-ART), Montane[®] 80/Montanox[®] 80/ γ -CD- C_{10} nanoreservoirs (NR-ART) and Montane[®] 80/PEG4000 stearate/ γ -CD- C_{10} nanoreservoirs (PEGylated NR-ART). ART release from nanocarriers has been assessed using the dilution–centrifugation method [35]. As seen in Fig. 11, γ -CD- C_{10} sphere and reservoir-type nanosystems exhibited a sustained ART release profiles. For both systems, a burst effect was observed (50% or 32% of drug release, respectively).

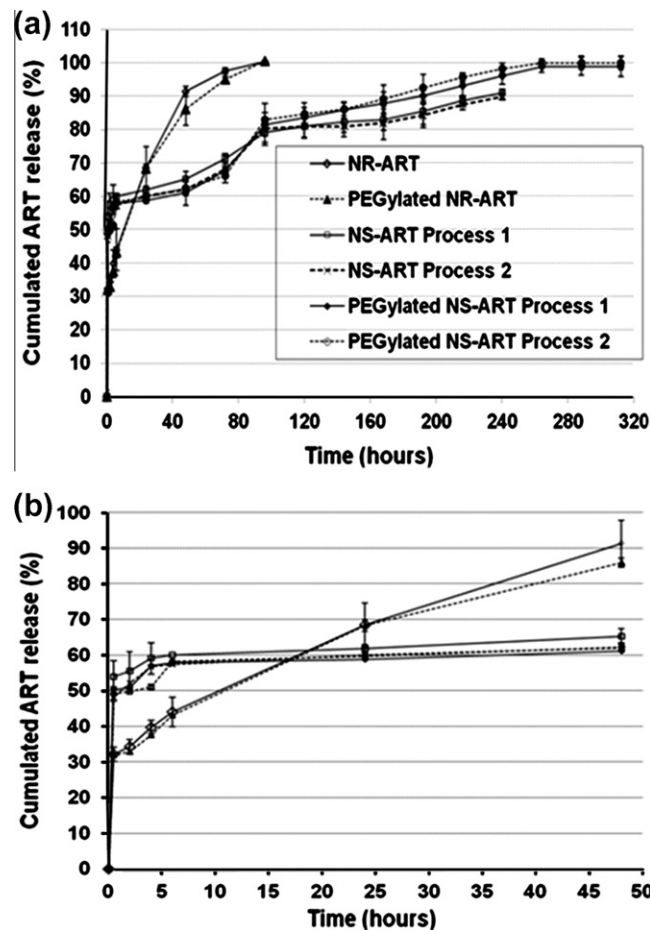


Fig. 11. *In vitro* release profiles of ART from γ -CD- C_{10} -based sphere and reservoir-type nanosystems ($n = 3$, SD) (a) and *in vitro* release profiles during the first 48 h (b). PEGylated NR-ART = PNR1.

The γ -CD- C_{10} based nanospheres showed a significant sustained release profile of ART extended up to 11 days. The rapid initial release of ART from particles (50% after 30 min) could be attributed to free solubilized ART and drug located near the surface of nanocarriers. The delayed release may be related to drug located within the matrix structure of nanospheres. The sustained release of drug from particles indicated that ART was more sequestered by the nanostructure. There might be a strong interaction between ART and γ -CD- C_{10} nanocarriers. As previously suggested, the interaction with the cavity of γ -CD- C_{10} may be considered. The influence of the size of cavity of modified CD has been observed in a previous release study involving diazepam (DZ) loaded CD- C_{10} nanospheres. The *in vitro* DZ sustained release was more pronounced in the case of γ -CD- C_{10} in comparison with DZ loaded α - and β -CD- C_{10} nanospheres [13]. So the drug was more retained by the γ -CD- C_{10} nanostructure. Besides the CD ring size and the drug itself, the site of CD modification seems to influence the drug release from amphiphilic β -CD nanocarriers. Indeed, different release profiles of camptothecin from β -CD- C_6 (modified on the secondary face) and 6-O-Capro- β -CD (modified on the primary face) nanoparticles were obtained by Cirpanli et al. [36]. Both camptothecin-loaded nanoparticles exhibited a biphasic release comprising an initial burst (30% after 2 and 5 h, respectively) followed by a sustained phase extended up to 6 or 12 days, respectively. In turn, all these parameters may influence the internal self-organization of CD molecules, the accessibility of the oligosaccharides by the drug, its location within the nanostructure and thus its drug release from the nanocarrier. We have recently revealed a correlation between

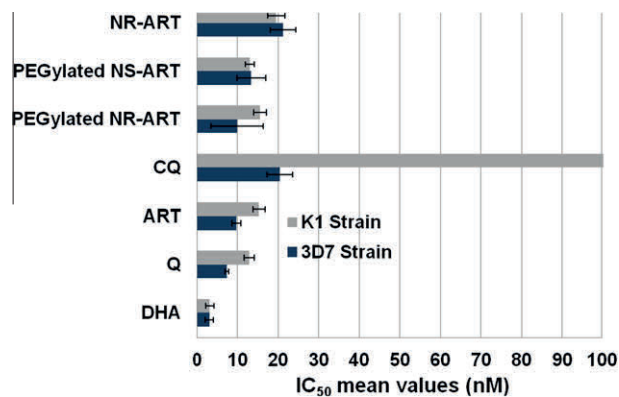


Fig. 12. IC₅₀ values (nM) of ART-loaded nanosystems and reference drugs on 3D7 and K1 strains of *P. falciparum*. The measured IC₅₀ of CQ on the strain K1 = 227.8 nM. The IC₅₀ cutoff values used to define resistance of reference drug: DHA > 30 nM, ART > 30 µg/mL (>106 nM), CQ > 100 nM, Q > 500 nM. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the substitution degree of β -CD-C₁₀ and the internal structure of formulated nanospheres [15]. Lamellar and hexagonal supramolecular organizations were identified by small-angle X-ray scattering and TEM for β -CD-C₁₀ characterized by DSs of 3.8 and 6.6, respectively. In this context, the study of the ultrastructure of the unloaded and loaded γ -CD-C₁₀ nanosphere suspension is a key point to better understand the way the host and guest interact. This will be the object of another study.

In the present study, the slight differences observed in the median values between the two processes (1 and 2) release data were not statistically significant ($P \geq 0.200$). In addition, the stabilization of nanoparticles with PEG4000 stearate did not significantly influence the release profiles of ART from nanocarriers during the first period. The incomplete cumulated ART release (90%) exhibited by non-PEGylated nanospheres was the consequence of nanosphere flocculation occurring at day 10.

ART associated with the nanoreservoirs was released during a period of approximately 96 h. About 30% of drug was released into the aqueous medium after 30 min. These release kinetics displayed then a slower profile over 96 h. The slow release profile of the remaining drug suggested that the release of drug located within lipophilic core of the reservoirs is mainly governed by the drug partition between the oil core and the aqueous external medium and the diffusion of drug through the reservoir shell.

The results of the ART release from the nanocarriers were very reproducible. The biphasic release profiles are expected to meet a rapid high dose of ART (in cases of severe malaria) together with ART plasma levels over a prolonged period owing to the hydrophilic PEG corona.

3.5. *In vitro* antimalarial activity

The ART-loaded nanoparticles and the reference drugs were assayed against 3D7 and K1 strains of *P. falciparum*. Non-PEGylated ART-loaded nanospheres were not assayed for antimalarial activity since they were unstable in RMPI medium.

The IC₅₀ values obtained after correlation with *in vitro* release results are reported in Fig. 12. The order of activity of the reference drugs against both strains was as follows: DHA < Q < ART < CQ. The two strains of *P. falciparum* were highly sensitive to ART-loaded nanosystems with low IC₅₀ values. The mean IC₅₀ values were in the range 9.9–21.3 nM (2.8 and 6.0 ng mL⁻¹). The strain 3D7, which is susceptible to chloroquine, yielded IC₅₀ values of 9.9, 13.4, and 21.3 nM, respectively, for PEGylated nanoreservoirs,

PEGylated NS made by process 1, and non-PEGylated nanoreservoir systems, whereas the strain K1, which is resistant to chloroquine, showed IC₅₀ values of 15.6, 13.0, and 19.5 nM, respectively. The *in vitro* activities against 3D7 and K1 strains of all ART-loaded colloidal suspensions were significantly comparable to that of ART reference (IC₅₀ = 9.8 nM (3D7) and 15.3 nM (K1), 0.001 ≤ P ≤ 0.02), excepted for non-PEGylated ART-loaded nanoreservoir suspension. However, the high IC₅₀ values in the latest case (21.3 nM and 19.5 nM on the strains 3D7 and K1 respectively) was in the range of ART sensitivity (sensitivity threshold of the ART = 106 nM). In another hand, all the tested ART-loaded colloidal suspensions were more active than chloroquine drug even on the chloroquine-sensitive strain.

The results from this study indicate that ART-loaded nanosystems, mainly PEGylated ones exhibit satisfactory *in vitro* activity against Chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *P. falciparum*. These findings suggest that neither additive nor antagonistic effect was observed when ART was associated with γ -CD-C₁₀ nanocarriers. In addition, the OD values obtained with unloaded nanocarriers were comparable to those of negative control, suggested that γ -CD-C₁₀ nanocarriers have no effect on parasite growth in the test conditions. However, this assumption must be confirmed by a cytotoxic study, which will determine the selectivity index (ratio between cytotoxic and antimalarial activities).

4. Conclusion

Biosynthesized β - and γ -CD-C₁₀ are able to form supramolecular assemblies such as nanospheres and reservoir-type nanosystems in the conditions of solvent displacement. PEG surface-decorated nanostructures were developed via the interaction of PEG fatty acid esters of different chain length and CD-C₁₀ derivatives. The two types of developed nanostructures were able to associate artemisinin. Stable formulations associated with high drug content were obtained with γ -CD-C₁₀. *In vitro* release characteristics showed an extended release from 4 to 12 days, which was not influenced by the presence of the hydrophilic corona. *In vitro* antimalarial activity data indicate that both ART-loaded nanosystems are potentially interesting for clinical applications. These colloidal nanocarriers may provide a promising alternative for injectable use of ART. *In vitro* cytotoxicity, complement activation, and macrophage uptake as well as biodistribution studies are in progress in order to assess the safety and stealthiness of these colloidal drug delivery systems.

Acknowledgments

The authors thank Christine Brunet-Manquat and Delphine Levilly (DPM) as well as Paul Lamoussa Ouattara (CNRFP) for their technical assistance. We also thank the French Embassy in Burkina Faso for the financial support of Josias Yaméogo.

References

- [1] World Health Organization (WHO), Management of Severe Malaria: A Practical Handbook, second ed., 2000, 84p.
- [2] M.E. Van Agtmael, T.A. Eggelte, C.J. van Bostel, Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication, *TiPS* 20 (1999) 199–205.
- [3] J.F.S. Ferreira, J. C Laughlin, N. Delabays, P.M. Magalhaes, Cultivation and genetics of *Artemisia annua* for increased production of the anti-malarial artemisinin, *Plant Genet. Resour.* 3 (2005) 206–229.
- [4] J.W. Wong, K.H. Yuen, Inclusion complexation of artemisinin with α -, β - and γ -cyclodextrins, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29 (2003) 1035–1044.
- [5] J.W. Wong, K.H. Yuen, Improved oral bioavailability of artemisinin through inclusion complexation β - and γ -cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* 227 (2001) 177–185.

- [6] N.G. Sahoo, A. Abbas, Z. Judeh, C.M. Li, K.-H. Yuen, Solubility enhancement of poorly water-soluble antimalarial drug: experimental design and use of a modified multifluid nozzle pilot spray drier, *J. Pharm. Sci.* 98 (1) (2009) 281–296.
- [7] B. Chimanuka, M. Gabriels, M.-R. Dtaevernier, J.A. Plaizier-Vercammen, Preparation of β -artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescence parasitemia in *Plasmodium chabaudi* malaria-infected mice, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 28 (2002) 13–22.
- [8] M. Gabriels, Physical and chemical evaluation of liposomes, containing artesunate, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 655–667.
- [9] M. Owais, G.C. Varshney, A. Choudhury, S. Chandra, C.M. Gupta, Chloroquine encapsulated in malaria-infected erythrocytes-specific antibody-bearing liposomes effectively controls chloroquine-resistant *Plasmodium berghei* infections in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 180–184.
- [10] V.C.F. Mosqueira, P.M. Loiseau, C. Bories, P. Legrand, J.-P. Devissaguet, G. Barrat, Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsules formulations of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 1222–1228.
- [11] L. Choïnard, A. Gèze, B.G.J. Yaméogo, J.-L. Putaux, D. Wouessidjewe, Miscellaneous nanoaggregates made of CD esters synthesised by an enzymatic pathway, *Int. J. Pharm.* 344 (2007) 26–32.
- [12] L. Choïnard, A. Gèze, J.-L. Putaux, Y.S. Wong, D. Wouessidjewe, Novel nanoparticles of β -cyclodextrin esters obtained by self-assembling of biotransesterified β -cyclodextrins, *Biomacromolecules* 7 (2006) 515–520.
- [13] A. Gèze, L. Choïnard, J.-L. Putaux, D. Wouessidjewe, Colloidal systems made of biotransesterified cyclodextrins grafted with C10 alkyl chains, *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 458–462.
- [14] O. Arnaud, A. Boumendjel, A. Gèze, M. Honorat, E.L. Matera, J. Guitton, W.D. Stein, S.E. Bates, P. Falson, C. Dumontet, A. Di Pietro, L. Payen, The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan, *Eur. J. Cancer* 47 (2011) 640–648.
- [15] L. Choïnard, A. Gèze, C. Vanharverbeke, J.B.G. Yaméogo, J.-L. Putaux, B. Brasme, L. Julien, S. Boulanger, C. Elfakir, D. Wouessidjewe, Physicochemical characterization of α -, β - and γ -cyclodextrins bioesterified with decanoate chains used as building blocks of colloidal nanoparticles, *Biomacromolecules* 12 (8) (2011) 3031–3038.
- [16] S.S. Zhao, High-performance liquid chromatographic determination of artemisinin (qinghaosu) in human plasma and saliva, *Analyst* 112 (1987) 661–664.
- [17] A. Gèze, J.-L. Putaux, L. Choïnard, P. Jehan, D. Wouessidjewe, Long-term shelf stability of amphiphilic beta-cyclodextrin nanosphere suspensions monitored by dynamic light scattering and cryo-transmission electron microscopy, *J. Microencapsul.* 21 (6) (2004) 607–613.
- [18] B.A. Avery, K.K. Venkatesh, M. A Avery, Rapid determination of artemisinin and related analogues using high-performance liquid chromatography and an evaporative light scattering detector, *J. Chromatogr. B* 730 (1999) 71–80.
- [19] A. Gansané, S. Sanon, L.P. Ouattara, A. Traoré, S. Hutter, E. Olivier, N. Azas, S. Traoré, I.P. Guissou, S.B. Sirima, I. Nebié, Antiplasmodial activity and toxicity of crude extracts from alternative parts of plants widely used for the treatment of malaria in Burkina Faso: contribution for their preservation, *Parasitol. Res.* 106 (2010) 335–340.
- [20] P. Druilhe, A. Moreno, C. Blanc, P.H. Brasseur, P. Jacquier, A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64 (5,6) (2001) 233–241.
- [21] E. Fattoruso, S. Parapini, C. Campagnuolo, N. Basilico, O. Tagliatella-Scafati, D. Taramelli, Activity against *Plasmodium falciparum* of cycloperoxyde compounds obtained from the sponge *Plakortia simplex*, *J. Antimicrob. Chemother.* 50 (2002) 883–888.
- [22] M.T. Makler, J.M. Ries, J.A. Williams, J.E. Brancroft, R.C. Piper, B.L. Gibbins, D.J. Hinrichs, Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48 (1993) 739–741.
- [23] E. Lemos-Senna, D. Wouessidjewe, S. Lessieur, F. Puisieux, G. Couarraze, D. Duchêne, Evaluation of hydrophobic drug loading characteristics in nanoprecipitated amphiphilic cyclodextrin nanospheres, *Pharm. Dev. Technol.* 3 (1) (1998) 85–94.
- [24] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed., PhP, 917p.
- [25] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharm. Res.* 19 (6) (2002) 875–880.
- [26] F. Quaglia, L. Ostacolo, A. Mazzaglia, V. Villari, D. Zaccaria, M.T. Sciortino, The intracellular effects of non-ionic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles in the delivery of anticancer drugs, *Biomaterials* 30 (2009) 374–382.
- [27] M. Teixeira, M.J. Alonso, M.M. Pinto, C.M. Barbosa, Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59 (2005) 491–500.
- [28] A. Gèze, L. Tieu Chau, L. Choïnard, J.P. Mathieu, D. Marti-Battle, L. Riou, J.-L. Putaux, D. Wouessidjewe, Biodistribution of intravenously administered amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres, *Int. J. Pharm.* 344 (1–2) (2007) 135–142.
- [29] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.-P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials* 27 (24) (2006) 4356–4373.
- [30] M. E. Martinez-Barbosa, S. Cammas-Marion, L. Bouteiller, C. Vauthier, G. Ponchel, PEGylated degradable composite nanoparticles based on mixtures of PEG-b-poly(γ -benzyl L-glutamate) and poly(γ -benzyl L-glutamate), *Bioconjugate Chem.* 20 (2009) 1490–1496.
- [31] N.T. Huynh, E. Roger, N. Lautram, J.-P. Benoit, C. Passirani, The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: passive versus active targeting, *Nanomedicine* 5 (9) (2010) 1415–1433.
- [32] R. Grief, M. Luck, P. Queller, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blank, R.H. Muller, Stealth corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): the influence of corona (PEG chain length and surface density) and the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids Surf. B* 18 (2000) 301–313.
- [33] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, Capture of stealth nanoparticles by body's defences, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 18 (2001) 527–550.
- [34] G.P. Zara, R. Cavalli, A. Bargoni, A. Fundaro, D. Vighetto, M.R. Gasco, Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues, *J. Drug Target.* 10 (4) (2002) 327–335.
- [35] L. Polato, L.M. Benedetti, L. Callegaro, P. Couvreur, *In vitro* evaluation of nanoparticle formulations containing gangliosides, *J. Drug Target.* 2 (1994) 53–59.
- [36] Y. Cirpanli, E. Bilensoy, A.L. Dogan, S. Calis, Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (2009) 82–89.

Publication de résultats N°2**Evaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* des suspensions colloïdales**

Nous avons montré dans l'étude précédente que les nanoparticules de γ -CD-C₁₀ pouvaient constituer une alternative pour le développement de formes injectables d'ART. Egalement, dans le but d'étendre le temps de circulation sanguine des nanoparticules, le concept de co-nano-assemblage de la γ -CD-C₁₀ avec des dérivés amphiphiles PEGylés a été appliqué et a permis d'obtenir des édifices supramoléculaires de type sphères ou réservoirs décorés en surface. En plus des formulations initiales stabilisées avec les esters de PEG et d'acides gras de masses molaires 1000, 1500 et 4000 Da, l'opportunité de modifier la surface des nanoparticules avec des chaînes de PEG intermédiaires (2000 Da) a été testée avec succès via la mise en œuvre de conjugué phospholipide-PEG (DMPE-mPEG2000).

Afin de consolider ce concept, la capacité de ces nanoparticules décorées en surface à échapper, du moins temporairement, aux systèmes des phagocytes mononucléés a été évaluée dans la présente partie de notre travail expérimental. Des études *in vitro* d'activation des protéines du complément sérique et de capture par les macrophages ont d'abord été réalisées avec les nanovecteurs décorés ou non en surface et renfermant pas de l'ART. Ensuite, des études pharmacocinétiques de biodistribution chez l'animal ont été réalisées pour compléter les résultats obtenus *in vitro*. Des traceurs fluorescents ont été associés aux nanostructures pour permettre de suivre la phagocytose par les cellules de macrophage ou le devenir *in vivo* des nanoparticules. Enfin, la toxicité des nanosuspensions vis-à-vis des érythrocytes a été évaluée.

Les différentes formulations n'ont pas démontré de caractère hémolytique aux concentrations utilisées *in vivo*. Les nanovecteurs modifiés en surface avec le polysorbate 80, le stéarate de PEG1500 ou le DMPE-mPEG2000, selon la structure des particules, consomment moins le complément ou sont moins phagocytés comparés aux particules de γ -CD-C₁₀ non PEGylées. L'imagerie de fluorescence *in vivo* a permis de montrer qu'une partie des nanosphères décorées par le DMPE-mPEG2000 et, dans une certaine mesure des nanocapsules contenant le polysorbate 80, pouvaient circuler dans le compartiment sanguin pendant au moins 24 heures. Les autres particules sont rapidement éliminées du système vasculaire dès les quinze premières minutes et s'accumulent principalement au niveau du foie et de la rate.

***En préparation pour soumission à
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.***

Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers. II: *in vitro* behaviour toward the immune system and *in vivo* biodistribution assessments

Josias B.G. Yaméogo^{1,3}, Annabelle Gèze¹, Luc Choisnard¹, Jean-Luc Putaux², Catherine Passirani⁴, Michelle Keramidas⁵, Jean-Luc Coll⁵, Rasmané Semdé³, Denis Wouessidjewe¹

¹ DPM, UMR CNRS 5063, ICMG FR 2607, Faculty of Pharmacy, University of Grenoble, France

² CERMAV, UPR CNRS 5301, ICMG FR 2607, Grenoble, France

³ UFR/SDS, University of Ouagadougou, Burkina Faso

⁴ INSERM U646, Ingénierie de la vectorisation particulière, Université d'Angers, 49100 Angers, France

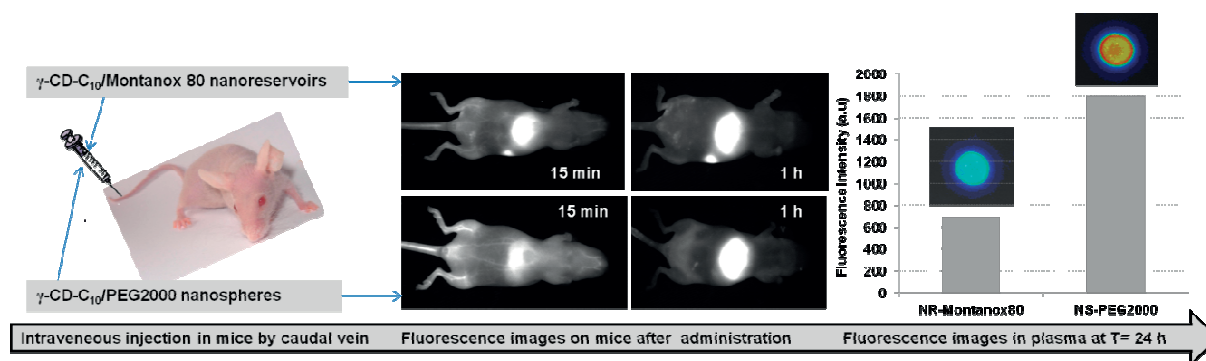
⁵ INSERM CRI U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble Cedex 9, France

Correspondence to: Annabelle Gèze, Tel.: +33 476635301, Fax: +33476635322, E-mail address: annabelle.geze@ujf-grenoble.fr

Abstract

In a previous study, we reported the formulation of Artemisinin-loaded surface-decorated nanoparticles by co-nanoprecipitation of PEG derivatives and biosynthesized γ -CD fatty esters. As our goal was to prepare long-circulating nanocarriers for systemic delivery of Artemisinin (ART), we evaluated the capacity of these surface-modified γ -CD-C₁₀ particles to modulate *in vitro* complement activation, macrophage uptake and hemolytic properties as well as their biodistribution features in mice. These experiments showed that the *in vitro* plasma proteins adsorption and phagocytosis by macrophage cells triggered by γ -CD-C₁₀ nanoparticles could be significantly reduced when their surface was decorated with amphiphilic PEGylated molecules, in particular PEG1500 stearate, DMPE-mPEG2000 or polysorbate 80. The prolonged blood circulation time assessed by fluorescence imaging was demonstrated for nanospheres and nanoreservoir-type particles containing DMPE-mPEG2000 and polysorbate 80, respectively. These nanomaterials also proved to be non-hemolytic in the concentration range used *in vivo*, with a slight decrease of their toxicity when associated to ART. Within the limits of experiments that were conducted, the co-nanoprecipitation technique may be considered as an alternative for surface modification of amphiphilic CD-based drug delivery systems.

Graphical abstract



Keywords: bioesterified γ -cyclodextrins, Artemisinin, surface-decorated nanoparticles, haemolytic properties, stealth properties, biodistribution.

1. Introduction

The therapeutic application of artemisinin (ART), a well-known antimalarial drug isolated from medicinal plant (*Artemisia annua*), is significantly restricted by its poor aqueous solubility, short half-life and high first-pass metabolism [1, 2]. In order to enhance ART solubility and/or bioavailability, cyclodextrins (CDs) inclusion complexes, spray-drying of ART with maltodextrins and liposomes were proposed [3-7]. In this respect, we previously reported that colloidal nanosystems based on biosynthesized γ -CD fatty esters may provide a promising alternative formulation for injectable ART dosage form [8]. The γ -CD derivative considered in this study, referred to as γ -CD-C₁₀ in the following, was prepared by a one-step procedure by thermolysin-catalyzed acylation using vinyl-decanoate ester as alkyl chains donor and was fully characterized using routine physicochemical techniques such as liquid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry [9]. The resulting biosynthesized amphiphilic derivatives are of interest for pharmaceutical applications in view of their ability to self-organize in water and form stable colloidal suspensions of either solid or reservoir-type nanoparticles, depending on the experimental conditions [8-12]. These nanodevices showed a very high ART entrapment. Furthermore, the prolonged drug release over several days as well as the sequential kinetic profiles could be attributed to the specific fixation sites of ART within the nanostructures [8]. The anti-plasmodium activity of ART-loaded formulations was also evidenced on resistant and susceptible *P. falciparum* strains [8].

ART being only active on blood-stage parasites [2], ensuring a sufficient blood circulation time of the nanocarriers is a prerequisite to give a chance for ART to reach infected erythrocytes and blood circulating parasites after systemic administration [13]. Gèze et al. [14] showed that amphiphilic CDs nanoparticles present a rapid hepatosplenic tropism, suggesting that further surface modification, such as decoration of the surface with polyethylene glycol (PEG), was required in order to improve the blood mean residence time of these nanoparticles. Indeed, the adsorption of plasma proteins, such as complement system proteins, at the surface of particles (the so-called opsonization process) is responsible for the recognition of carriers by macrophages and, as a consequence, for the short lifetime in the bloodstream [15-17]. This constitutes a limitation for the development of long-circulating drug delivery systems targeting sites other than the mononuclear phagocyte system (MPS) [17].

In a previous paper, we described the preparation of PEG surface-decorated nanoparticles by co-nanoprecipitation of PEG fatty acid esters and γ -CD-C₁₀ molecules [8]. We also demonstrate that the integration of the amphiphilic PEGylated molecules within the γ -CD-C₁₀

nanostructures did not influence the *in vitro* release properties and anti-malarial activity of ART-containing colloidal suspensions [8]. Even if these nanosystems appear to be attractive for medical application of ART, their use will be governed by their behavior toward the MPS and their biodistribution.

The purpose of this study was to evaluate and compare the hemolytic and stealth properties of these γ -CD-C₁₀-based colloidal drug delivery systems such as nanospheres and nanoreservoirs. The investigation of the stealthiness was carried out using two approaches: *in vitro* assessment by plasma-complement proteins activation and macrophage uptake assays and *in vivo* biodistribution studies in mice by fluorescence imaging technique. This paper reports on the *in vitro* and *in vivo* screening of γ -CD-C₁₀ surface-decorated and non-decorated nanoparticles.

2. Materials and methods

2.1. Materials

γ -CD-C₁₀ fatty ester (Mw = 2714 g.mol⁻¹, total degree of substitution = 9.2) was synthesized in our laboratory by enzymatically-assisted pathway using thermolysin as catalyser and decanoic vinyl esters (C₁₀) as acyl donors. Parent γ -CD (Kleptose[®]) was provided by Roquette (Lestrem, France). Thermolysin (EC 3.4.24.27), a protease type X isolated from *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, anhydrous DMSO (99 %), vinyl decanoate (95 %) and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, Mw = 933.88 g.mol⁻¹) were obtained from Sigma-Aldrich (l'Isle d'Abeau Chesnes, France). Artemisinin (C₁₅H₂₂O₅, 98 %, Mw = 282.3 g.mol⁻¹) was purchased from Carl Roth (GmbH). Montane[®] 80 (sorbitan mono-oleate) and Montanox[®] 80 (polysorbate 80, ethoxylated sorbitan mono-oleate) of pharmaceutical grade were kindly provided by Seppic (Castres, France). Benzyl benzoate was supplied by Cooper (Melun, France). Polyethylene glycol stearate (PEG1500 and PEG4000) were purchased from Stearinerie Du Bois (France). Dimyristoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000 (DMPE-mPEG2000) was obtained from Corden Pharma (Eichenweg, Switzerland). Percoll[®] gradient density marker beads kit was from Sigma-Aldrich (USA). 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiD, Mw = 1052.07 g.mol⁻¹) was from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Normal human serum (NHS) distributed into eppendorf tube was provided by *Etablissement Français du Sang* (Angers, France) and was stored at -80°C until 6 months maximum. Sheep erythrocytes (16 % hematocrit, stored at 4°C up 2 weeks) and Rabbit anti-sheep erythrocytes antibodies (hemolytic serum, 5.000 units) were supplied by Eurobio (Courtabœuf, France). Diethylmalonylurea (5,5-diethylbarbituric acid) were obtained

from Fluka (Sigma Aldrich Chemie, GmbH). Sodium diethylmalonylurée (sodium diethyl barbital), calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $147.02 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), anhydrous magnesium chloride (MgCl_2 , $203.3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) were purchased from Merck (Darmstadt, GmbH). TPH-1 cells (human monocyte/macrophage cell line) were obtained by ATCC (Manassas, VA, USA). The organic solvents and sodium chloride (NaCl , 99.8 %) were from VWR International (Lyon, France). Water was freshly deionized in our laboratory. Stock solutions of buffers were prepared in our laboratory and stored at 4°C until 3 weeks.

2.2. Preparation of colloidal suspensions

γ -CD- C_{10} -based nanosphere and nanoreservoir suspensions (non-PEGylated or PEGylated, unloaded or ART-loaded) were prepared using the solvent displacement technique as described elsewhere [8]. The method consists in injecting, under magnetic stirring (500 rpm) at 25°C , an organic solution (10 mL) containing amphiphilic and lipophilic constituents into an aqueous phase containing water added or not with a hydrophilic stabilizing compound. The aqueous suspension of nanoparticles is then obtained after elimination of the organic solvent [8-12]. Amphiphilic PEGylated with various PEG molecular weights (1000, 1500, 2000 and 4000 Da) were investigated at the molar ratio γ -CD- C_{10} /PEG of 3:1. Fluorescent nanosuspensions were formulated in the same conditions by incorporating a carbocyanine dye (DiI or DiD initially dissolved in acetone) in the organic phase before the nanoprecipitation occurred. The resulting colloidal suspensions were purified by gel chromatography using Sephadex[®] G-75 columns (dry bead diameter = 40-120 μm , Sigma Aldrich, Sweden) in order to remove free PEG and/or free fluorescent marker in the supernatant. Prior to administration to the animals, the suspensions were rendered isotonic with a glucose solution.

Poly(methyl methacrylate) (PMMA) nanoparticles were used as positive control in the complement consumption study and were synthesized by the polymerization of methyl methacrylate (MMA 99 %, Fluka) according to the procedure described by Passirani *et al.* [18].

2.3. Physicochemical characterization of nanosystems

Mean size, polydispersity index (PI) and zeta potential were determined after appropriate dilution using a Zetasizer (Nano Serie DTS 1060, Malvern Instruments) [8-12]. The nanosystems were observed by transmission electron microscopy (TEM) after negative staining of the preparations with uranyl acetate, using a Philips CM200 'Cryo' microscope operating at 80 kV. The images were recorded on Kodak SO163 films [8-11]. The osmolarity

was also checked in triplicate with an automatic micro-osmometer Loser Messtechnik type 15. The density of the nanoparticles (assumed to be spherical) in the suspension was determined using isopycnic centrifugation of Percoll[®] gradients in iso-osmotic sucrose (0.25 M) at a ratio of 1:9 (v/v) [19]. The calibration of the Percoll[®] density gradient was performed using the density marker beads kit from Sigma-Aldrich (USA) as standards. The calibration curve ($r^2=0.97$, $y = 0.0935x^{15,685}$) was obtained by plotting the ratio of heights d/H (Figure 1) versus the density of each bead type (density range of beads is between 1.037 and 1.138 g.mL^{-1}). For density measurement, a volume of 0.1 mL (nanoreservoirs) or 0.25 mL (nanospheres) of colloidal suspension was added to the Percoll[®] medium (4.5 mL) in the centrifugal vials. The ultracentrifugation was performed at 100,000 g at 20 °C for 3 h (OPTIMA[™] L-80 XP Beckman Coulter, rotor SW60 Ti). From the density of particles (considered as volume mass of particles ρ_P , g.mL^{-1}), the absolute number of particles per volume unit (mL) of suspension (N) and particle surface area (S , $\text{cm}^2.\text{mL}^{-1}$) were calculated, assuming that particles were spherical and using the following equations [19]:

$$N = 6C/(\pi d^3 \rho_P) \quad (1)$$

$$S = N\pi d^2 \quad (2)$$

where C is the dry material concentration (g.mL^{-1}) and d (cm) the particle diameter determined by quasi-elastic light scattering.

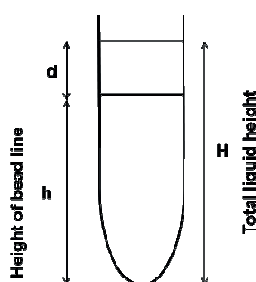


Fig. 1. Schematic representation of isopycnic centrifugation Percoll[®] gradient density measurement in iso-osmotic sucrose (0.25 M).

2.4. Determination of drug and fluorescent marker loading

The total concentration of ART recovered in the colloidal suspensions (C_t) was determined, after a sample dilution with methanol, by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to evaporative light scattering detection (ELSD) according to a validated method ($r^2=0.9937$; $y = 1.6569x + 0.8847$) [8] adapted from Avery *et al.* [20]. The HPLC system was

constituted by a Varian Prostar pump and an ELSD Sedex Model 55 (Touzart & Matignon, France). 20 μL sample sloop, Kromasil C_{18} column (250 x 4.6 mm, 5 μm particle size) from Supelco Inc., methanol-water (70:30, v/v) mobile phase, 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ flow-rate, detector temperature at 32 $^{\circ}\text{C}$, carrier gas pressure at 2.2 bar and signal gain at 12 were used as chromatographic conditions.

The amount of fluorescent marker (Dil or DiD) associated to the nanocarriers was quantified using a RF-1501 spectrofluorophotometer (Shimadzu). The suspension was diluted with methanol and analyzed in the following conditions: i) for Dil: excitation wavelength, $\lambda_{\text{ex}} = 549$ nm; emission wavelength, $\lambda_{\text{em}} = 562$ nm; $r^2=0.997$; $y = 427,796x + 98.055$. ii) for DiD: $\lambda_{\text{ex}} = 643$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 669$ nm; $r^2=0.994$; $y = 923,744x + 68.145$. Six calibration standards were prepared in methanol for each fluorescent marker, and analyzed in triplicate. The calibration curves were obtained by plotting the fluorescence results *versus* the concentration of the standards ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.5. Evaluation of stability of Dil or DiD-loaded nanosystems

The binding of a fluorescent marker to nanostructures was first evaluated using gel chromatography separation on Sephadex[®] G-75. The stability was also tested after centrifugation of suspensions under gentle conditions (15,000 g at 20 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min) in order to visualize any precipitation of unloaded Dil or DiD [21]. The suspensions were then stored at room temperature during 15 days and their stabilities were assessed in terms of appearance, particle size, polydispersity index and Dil or DiD recovery.

Fluorescent colloidal suspensions were also submitted to dialysis during 48 h in order to quantify the Dil or DiD that remained associated to nanoparticles in physiological conditions [22]. 3 mL of fluorescent colloidal suspension were thus packed into a dialysis bag (regenerated cellulose membrane Cellu Sep[®] T1 19 mm, MWCO: 3,500 Da, Orange Scientific, Belgium) and placed in a 50 mL PBS (0.1 M, pH 7.4) medium maintained at 37 $^{\circ}\text{C}$ under stirring at 50 rpm. At given time intervals, a sample was taken from the external buffer medium and replaced by the same volume of fresh buffer in order to make sink conditions. After 48 h, a sample was taken from the dialysis bag and the concentration of Dil or DiD was determined by spectrofluorophotometry and compared to the concentration of fluorescent marker before the dialysis experiment. The percentage of remaining Dil or DiD was then calculated.

2.6. *In vitro* complement consumption study

Complement consumption was assessed in normal human serum (NHS) by measuring the residual haemolytic capacity of the complement system after contact with the different nanoparticles according to a well-established procedure [18, 21, 24-26]. The technique consists in determining the amount of serum required to lyse 50 % of a fixed number of sensitized sheep erythrocytes (CH50 units). Briefly, increasing amounts of colloidal suspensions (25, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 250 μL) were diluted with respectively 275, 250, 200, 175, 150, 125, 100 and 50 μL of VBS²⁺ (Veronal buffered saline containing 0.15 mM Ca²⁺ and 0.5 mM Mg²⁺). Each dilution was then incubated (37 °C, 60 min, under gentle stirring) with 100 μL of NHS to allow the reaction between serum components and nanoparticles. After incubation, these mixtures were diluted with VBS²⁺ (1:24 v/v) then incubated (37 °C, 45 min, under gentle stirring) with a suspension of sheep erythrocytes sensitized by haemolytic serum (1:4 v/v). The reaction was stopped by adding ice-cold NaCl (0.15 M, 2 mL) and unlysed erythrocytes separated by centrifugation (2,000 rpm, 10 min, 4 °C). The optical density of supernatant, related to the haemolytic capacity of the serum, was recorded at 405 nm using a microplate reader (Multiskan Anscant, Labsystems SA, Cergy-Pontoise, France). The results were expressed in terms of CH50 unit consumption percentage as a function of particle surface area.

2.7. *In vitro* haemolytic activity assessment

The haemolytic properties of loaded and unloaded nanoparticles were carried out on sheep erythrocytes together with the complement activation study. Indeed, in order to validate CH50 tests, internal controls were realized in order to determine hemolysis caused by the particles themselves without involvement of complement proteins. The red blood cell suspensions were incubated in the same conditions that CH50 test with nanoparticle suspensions at concentrations of 600 and 1200 $\text{cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$ surface area. Natural haemolysis of erythrocytes (0 %) and total haemolysis (100 %) were also carried out by incubating erythrocytes with VBS²⁺ or distilled water, respectively. After incubation and then centrifugation, the supernatant was collected and analyzed for hemoglobin content by optical density (OD) measurement (Multiskan microplate reader) at 405 nm. All these data were analyzed to determine the specific haemolytic activity of each type of formulation. The degree of haemolysis is expressed as the ratio of the OD values and calculated by the following equation:

$$\text{Haemolysis (\%)} = (\text{OD}_{\text{particles}} - \text{OD}_{0\%}) / (\text{OD}_{100\%} - \text{OD}_{0\%}) \times 100 \quad (3)$$

where $OD_{0\%}$ and $OD_{100\%}$ are the optical densities measured for supernatant at 0 % and 100 % haemolysis, respectively.

2.8. *In vitro* macrophage uptake evaluation

Cell cultures and macrophage uptake determination were performed according to the procedure described by Morille *et al.* [21]. TPH-1 cells were grown in suspension in a humidifier-incubator (5 % CO_2 , 37 °C) in RPMI 1640 medium suggested by ATCC, and then cultured for 48 h to allow differentiation and adherence. Non-adherent cells were removed by aspiration and the remaining adherent cells were incubated for 24 h in a new medium. Cells were collected and counted with haemocytometer using Trypan blue exclusion assay. Cells ($0.6 \times 10^5/mL$) were finally placed one day before phagocytosis experiments on sterile 24-well cell culture clusters, and then allowed to recover for 24 h at 37 °C.

For the uptake assessment, differentiated cells (450,000 per well) were incubated in RPMI 1640 medium (500 μL per well) in the presence of DiI-labeled colloidal suspensions (concentration of particles of $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in the culture medium). The incubation was carried out in parallel at 37 °C and 4 °C for 90 min under stirring. The incubation at 4 °C allows inhibiting the phagocytosis and evaluating the particles adsorbed on cell membranes. After the incubation time, macrophages were washed twice with PBS (pH 7.4), detached with trypsin and resuspended in 0.4 % (w/v) trypan blue solution to quench the extracellular fluorescence, thus enabling determination of the internalized fractions. The resuspended cells were subsequently washed twice and analyzed by flow cytometer (FACS) and CellQuest software (Becton Dickinson) with 10,000 cells measured in each sample. The mean fluorescence intensity of non-exposed cells was also recorded as control. Experiments were performed in triplicate.

2.9. *In vivo* biodistribution study

Biodistribution studies of γ -CD- C_{10} nanocarriers were carried out in mice by using non-invasive *in vivo* fluorescent imaging technology [27-31] based on the monitoring of bioluminescence after intravenous injection of DiD labeled γ -CD- C_{10} nanoparticles.

Female 6 week-old NMRI nude mice were obtained from Janvier Laboratory (Le Genest-Saint Isle, France) and were care in strict accordance with French Ministry of Agriculture regulations. Animals were distributed in height experimental groups ($n = 3$ to 4 animals per group), each group corresponding to a determined type of tested γ -CD- C_{10} colloidal

suspension. For experiments, mice were anesthetized (Isoflurane 2 %) and then injected intravenously by tail vein with 200 μL of DiD labeled $\gamma\text{-CD-C}_{10}$ nanoparticle suspension ($35 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ of dye). Mice were illuminated by 660 nm light under anesthesia and movies were acquired over 15 min. Fluorescence images (660 nm laser; P1, 1X1M in different settings: 100, 200 and 500 ms) were then taken after 15 min, 1, 3, 5 and 24 h with a back-thinned CCD camera (C4742-98 ORCALL-BTS-512G, Hamamatsu, Massy, France) fitted with high-pass RG 665 filter (Schott, Clichy, France) [27]. Imaging of mice prior to injection was also performed to quantify the autofluorescence of mice which served as control.

After 24 h, blood samples were taken by cardiac puncture after an injection of heparin solution (heparin Na 25,000 UI; 40 μL). Blood was then centrifuged at 8,000 rpm for 3 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ to separate plasma to red blood cells. Finally, mice were euthanized and different organs were removed. The biodistribution in the different organs (liver, spleen, kidney, stomach, intestines, adrenal, heart, lungs, brain, skin, muscles, fat, bladder, pancreas, uterus and ovaries), lymph and blood (whole blood, plasma, red blood cells) was determined by fluorescence imaging in the conditions described above.

2.10. Statistical analysis

All experiments were realized in triplicate and the results expressed as mean value \pm standard deviation (SD). The ANOVA variance analysis was applied to repeated measurements. The level of significance (P) was set at 5%.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characterization of $\gamma\text{-CD-C}_{10}$ colloidal carriers

Before reaching therapeutic targets, nanoparticles administered via the intravenous route are faced with different biological barriers such as uptake by MPS which is involved in a non-specific immune response of the organism by recognition of foreign bodies [15-17]. The particle characteristics such as mean size, zeta potential and surface area are important parameters and are correlated to the degree of interaction of nanocarriers with the MPS organs. In addition, it is now well-known that the surface modification of nanoparticles is a key parameter to obtain particles that are less recognized by the plasma proteins and MPS [15-17]. Here, bioesterified CD-based nanoparticles (spheres and reservoirs) loaded or not with ART were surface-decorated by co-nanoprecipitating the $\gamma\text{-CD-C}_{10}$ derivatives with variable PEG derivatives, taking advantage of the interaction between the aliphatic portions of the amphiphiles [8]. Four different polyoxyethylene (PEO) molecules with similar anchoring

group, different in chain lengths, lipophilic moieties and terminal groups, were investigated (Table 1).

Table 1.

Characteristics of PEG derivatives used for surface decoration of nanoparticles.

PEG derivative type	Hydrophobic group	Anchoring group	End group	Units of oxyethylene	Mean molecular weight (Mw, g.mol ⁻¹) of PEG chain
Polysorbate 80	Oleate	COOH	OH	20	1000
PEG 1500S	Stearate	COOH	OH	30	1500
PEG 4000	Stearate	COOH	OH	80	4000
DMPE-mPEG2000	Phospholipids (DMPE)	COOH	OCH ₃	40	2000

This study aimed at selecting the most suitable PEG derivative for CD nanoparticle surface modification. Table 2 summarizes the characteristics of the naked and surface-decorated nanoparticles.

Table 2

Physicochemical characteristics of unloaded and ART-loaded nanospheres (NS) and nanoreservoirs (NR) made from γ -CD-C₁₀.

Formulations	Mean size (nm)	PI	ζ (mV \pm SD)	ART Content (mg.mL ⁻¹)	Density at 20°C	Particle number/mL	Particle surface area (cm ² /mL)
γ-CD-C₁₀ unloaded nanosystems							
Non-PEGylated NS	64	0.08	-25 \pm 1	-	1.090	7.87.10 ¹²	1504
NS-PEG4000	79	0.09	-11 \pm 1	-	1.097	9.31.10 ¹²	1689
NS-PEG1500	77	0.10	-17 \pm 1	-	1.092	1.35.10 ¹³	1731
NS-PEG2000	85	0.12	-20 \pm 2	-	1.094	8.43.10 ¹²	1618
NR-Montanox80	175	0.07	-12 \pm 1	-	1.068	2.14.10 ¹²	2453
NR-PEG4000	180	0.05	-5 \pm 1	-	1.071	1.55.10 ¹²	1772
NR-PEG1500	179	0.06	-10 \pm 2	-	1.068	1.67.10 ¹²	1875
NR-PEG2000	180	0.04	-30 \pm 1	-	1.069	1.64.10 ¹²	1854
PMMA	195	0.04	-52 \pm 2	-	>1.138	4.83.10 ¹²	5759
γ-CD-C₁₀ ART-loaded nanosystems							
Non-PEGylated NS-ART	67	0.08	-20 \pm 2	0.28	1.088	1.17.10 ¹³	1652
NS-PEG4000-ART	78	0.07	-10 \pm 2	0.37	1.098	1.04.10 ¹³	1997
NS-PEG1500-ART	76	0.10	-18 \pm 1	0.37	1.092	9.79.10 ¹²	1823
NS-PEG2000-ART	90	0.20	-21 \pm 2	0.40	1.095	7.22.10 ¹²	1836
NR-Montanox80-ART	191	0.04	-28 \pm 1	1.65	1.069	2.18.10 ¹²	2501
NR-PEG4000-ART	187	0.07	-10 \pm 1	1.64	1.072	1.82.10 ¹²	2282
NR-PEG1500-ART	178	0.08	-10 \pm 1	1.62	1.068	2.08.10 ¹²	2413
NR-PEG2000-ART	204	0.07	-32 \pm 1	1.64	1.070	1.67.10 ¹²	2413

The CD-based colloidal suspensions were considered to be monodisperse (IP < 0.25), displaying mean size, zeta potential and drug dosage values in good agreement with previous observations [8]. While the colloidal stability of uncoated nanoparticles was very poor when in contact with electrolytes, all PEG-coated particles displayed good physical

stability in this medium. This high stability was attributed to the presence of the hydrophilic PEG corona, ensuring a steric hindrance at the surface of the nanoparticles. Independently of ART loading, the zeta potential values were negative for all type of γ -CD- C_{10} nanoparticles with higher absolute value for non-PEGylated nanoparticles (-27 mV). Despite the neutral charge of methoxy groups, the zeta potential values remained negative for PEG-coated particles. However, the particles coated by PEG-1500, Montanox[®] 80 and DMPE-PEG2000 presented increased zeta potential values in comparison to PEG4000. The low increase in average diameter, the shift of zeta potential absolute values as well as the stability in electrolyte-rich aqueous solution of nanospheres prepared with PEG4000 suggest the presence of PEG moieties at the surface of particles. It is known that PEG chains can form dipoles that are able to modify the negative surface charge of nanoparticles proportionally to their concentration [32]. Medium-chain-length PEGs (1000, 1500 or 2000 Da) were expected to form a high density brush around the particles [17]. The low value of zeta potential of PEG4000-coated particles (-11 and -5 mV for nanospheres and nanoreservoirs, respectively) may be due to the longer PEG chains and/or the weak density of PEG moieties on the surface of PEG4000-coated particles. A similar result was obtained with particles coated by carboxylated PEG which possess negative charges resulting in higher negative zeta potentials of PEG250-coated particles than those prepared with PEG2000 [31].

In order to perform the *in vitro* evaluations of γ -CD- C_{10} nanocarriers in cell cultures such as complement activation experiments, it is required to calculate the particle concentration as the number of particles per volume unit or as particle surface area. The density of the γ -CD- C_{10} nanoparticles was thus measured using isopycnic centrifugation on Percoll gradients in iso-osmotic sucrose [19]. The density was ranged between 1.07 and 1.10. It has to be noted that a density close to 1 is similar to that of plasma and therefore favorable to the intravenous administration. The slight difference in density between nanospheres and nanoreservoirs can be mainly attributed to the presence of benzyl benzoate in the inner core of nanoreservoirs. In addition, PMMA-based particles presented a denser structure than γ -CD- C_{10} -based particles (Table 2).

3.2. Haemolytic evaluation of γ -CD- C_{10} nanoparticles

In this study, non-decorated and γ -CD- C_{10} surface-decorated nanoparticles were evaluated and compared for their haemolytic properties in presence of sheep erythrocytes. Figure 2a presents the percentage of haemolysis induced by the various unloaded nanosuspensions when exposed at concentration of 600 and 1200 cm^2/mL surface area to erythrocyte cell suspensions. The concentration range covered by this experiment was quite high in regards

to particle surface area involved during an intravenous injection of 200 μL in mice (about 200 $\text{cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$). Despite that point, both $\gamma\text{-CD-C}_{10}$ nanospheres and nanoreservoirs did not cause more than 20 % haemolysis. The haemolytic effect of $\gamma\text{-CD-C}_{10}$ nanoparticles was found to be concentration-dependent, as reported by Bilensoy et al. and Quaglia et al. for amphiphilic $\beta\text{-CD}$ -based nanocarriers [33, 34]. These authors have demonstrated that nanoparticles made from $\beta\text{-CD-C}_6$ (parent CD modified on the secondary face with C_6 aliphatic chains), 6-*N*-capro- $\beta\text{-CD}$ (parent CD modified on the primary face with C_6 aliphatic chains) and heptakis (2-*O*-oligo(ethyleneoxide-6-hexadecylthio)- $\beta\text{-CD}$ are non-haemolytic (haemolysis rate ≥ 10 %) in the 0.01-2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ concentration range [33, 34]. It may be noted that nanospheres are significantly less haemolytic than nanoreservoirs with less than 5 % haemolysis considering both concentrations. This difference can be attributed to the presence of benzyl benzoate and surfactant in the nanoreservoir formulations. Indeed, some studies have revealed that the cytotoxicity profile of amphiphilic CD nanocarriers was influenced by various parameters such as the presence and the concentration of surfactant [35].

When comparing each nanosystem, it was found that particles coated by PEG4000 caused a significantly higher haemolysis, sometime 2-fold, than those coated by medium molecular weight PEG (1000, 1500 and 2000 Da). Regarding sphere-type systems, non-PEGylated particles caused 0.5 and 2.1 % haemolysis at 600 and 1200 cm^2 surface area whereas PEG1500 and PEG2000 containing particles induced about 0.1 and 0.3-0.4 % haemolysis at the same concentrations.

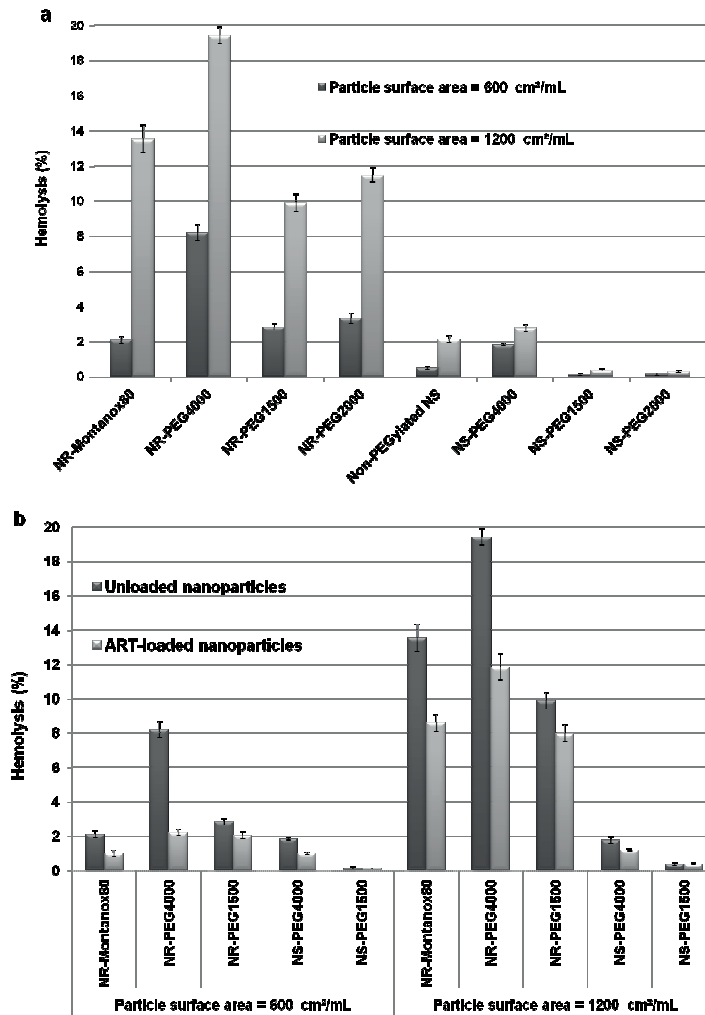


Fig. 2. Haemolysis on erythrocyte suspension of γ -CD-C₁₀ sphere and reservoir type nanocarriers as function of surface area, mean \pm SD ($n = 3$). (a) unloaded particles; (b) unloaded and ART-loaded particles

The haemolytic properties of unloaded and ART-loaded nanoparticles were also compared (Fig. 2b). At the same surface area, ART-loaded γ -CD-C₁₀ nanoparticles were slightly less haemolytic than the unloaded ones.

From these results, it can be concluded that γ -CD-C₁₀ colloidal drug carriers are non-haemolytic in injectable form and the surface modification by coating PEG moieties of molecular weight ranging from 1000 to 2000 Da as well as ART incorporation slightly reduce the percentage of haemolysis.

3.3. Plasma-complement proteins consumption

Following intravenous administration, nanoparticles are rapidly covered by plasma proteins such as proteins of complement system (C3 and C4 proteins), making the particles visible by macrophages, particularly those of liver, spleen or bone marrow, allowing their phagocytosis and their rapid removal from the bloodstream [15-17]. The modification of the nanoparticle

surface by attaching PEG moieties has resulted in a decrease of this opsonization process [24, 25, 36]. Taking advantage of PEGylated nanoparticles into account, various amphiphilic PEG linked to aliphatic (stearate) or phospholipid (DMPE) anchors were incorporated within the nanostructures of ART-containing γ -CD-C₁₀ nanoparticles. In order to predict the behavior of the PEGylated colloidal drug delivery systems toward the MPS and their stealth properties, *in vitro* measurements of functional activity of complement system and macrophage uptake were performed.

The functional activity of the complement system can be globally evaluated *in vitro* by measuring the total haemolytic activity (CH50) or, more precisely, one of two pathways of complement activation system (classical or alternative pathways) by immunochemical quantifications of the different fractions (C3 and C4) [18, 37, 38]. In our study, the determination of the functional activity of complement was carried out by a CH50 test performed in NHS by measuring the residual haemolytic capacity of complement after contact with the colloidal suspensions. The technique determines the amount of NHS able to cause lysis of 50 % of a given number of sheep erythrocytes sensitized by rabbit anti-sheep erythrocytes [19]. The lysis of erythrocytes by complement present in the serum was measured by the amount of released hemoglobin which is directly proportional to the activity of complement. When the serum is incubated with complement activator particles, a part of the complement proteins are activated and are not available to lyse erythrocytes. However, when the serum is incubated with poor complement activator particles, a residual activation of complement is measured. In order to assess and compare the *in vitro* interactions of the series of γ -CD-C₁₀-based nanoparticles with the complement system, kinetics of CH50 unit consumption were performed as a function of particle surface area. First, unloaded formulations of nanospheres and nanoreservoirs containing or not PEO derivatives were evaluated. Then, the effect of the incorporation of ART on the complement activation by the γ -CD-C₁₀ nanosystems was determined. Unloaded and non-PEGylated PMMA nanoparticles, known as strong-complement activators were used as positive control.

From the results, one can see that γ -CD-C₁₀ nanoparticles activate plasma-complement proteins in a dose-dependent profile. As seen in Figure 3a, excepted nanoreservoirs containing long PEG chains (2000 and 4000 Da), all tested γ -CD-C₁₀ nanoparticulate formulations exhibited lower CH50 unit consumption profiles than the control. Independently of the presence of PEG derivatives, γ -CD-C₁₀ nanospheres (size ranging from 65 to 85 nm) are lower complement activators than nanoreservoir systems (size about 180 nm). This observation is in agreement with the findings showing the role and importance of particle size on the adsorption of proteins. It has been reported that plasma proteins adsorption is weak onto particles smaller than 100 nm and increase with the particle size [17, 25, 39].

Figure 3b shows the complement activation profile of sphere-type systems. It is important to note that particles made of γ -CD-C₁₀ molecules only (non-PEGylated NS) were high complement activators with total consumption of CH50 units before 600 cm². However, when formulated with PEG1500 and PEG200 derivatives, significantly lower CH50 unit consumption is observed although the PEG containing particles are larger by 10 to 20 nm. One can note that in the conditions of intravenous injection in mouse (200 μ L of colloidal suspension, corresponding to a particle surface area of 200 cm².mL⁻¹), PEG1500 or PEG2000-containing γ -CD-C₁₀ nanosphere suspensions consume about 25 % of CH50 units while non-PEGylated particles consume about 50 %. The consumption of CH50 units was never higher than 50 % with PEG1500 and DMPE-mPEG2000 coated nanospheres, in the range of 0-800 cm².mL⁻¹ surface area, whereas reaching total complement consumption at 1000 and 1200 cm², respectively. In the light of these results, we can say that the decoration of the surface of γ -CD-C₁₀ nanospheres by PEG1500 stearate and DMPE-PEG2000 significantly reduces the adsorption of proteins. However, the decoration of the particle surfaces by hydrophilic molecules alone is not sufficient to induce a decrease in plasma proteins adsorption. Many other surface parameters can be involved such as the nature and the end-group of the selected PEG derivative [15-17, 40-42]. Our results show that γ -CD-C₁₀ nanospheres decorated by PEG4000 stearate displayed a complement activation profile equivalent to that of non-PEGylated particles. The high level of complement activation induced by PEG4000-coated nanospheres may be attributed to the conformation of PEG moieties on the surface of particle. Indeed various studies have shown that the decrease in the adsorption of proteins on the surface of nanoparticles was favored in the presence of covering molecules of molecular weights between 1500 and 3500 Da [36-42]. The organization of PEG4000 chains on the surface of particles may not lead to a good brush conformation around the γ -CD-C₁₀ particles making them more accessible by plasma proteins. The density of PEG4000 molecules on the surface of the particles can also be questioned. The high level of complement activation may be due to either a poor density of PEG unable to protect the particle against plasma proteins adsorption. Moreover, the rigidity of the PEG layer surrounding the particles may have an impact. Some authors have reported that the nanoparticles presenting a low density of long-chain PEG or rigid PEG corona did not prevent the protein adsorption [26, 36, 40]. Moreover, a higher density of PEG chains on the surface of nanoparticles was more easily formed with medium molecular weight PEG, such as 2000 Da, than higher ones [21]. In our study, the particles were prepared using the same molar ratio CD/PEG. The slightly higher mean size of PEG2000-coated particles in comparison to PEG4000-decorated ones may explain the difference of PEG chains density on the particle surface. Indeed, some authors reported an efficient protection of polystyrene nanoparticles (60-100 nm particle size) by PEG4000 with a coating thickness of 5 nm [16].

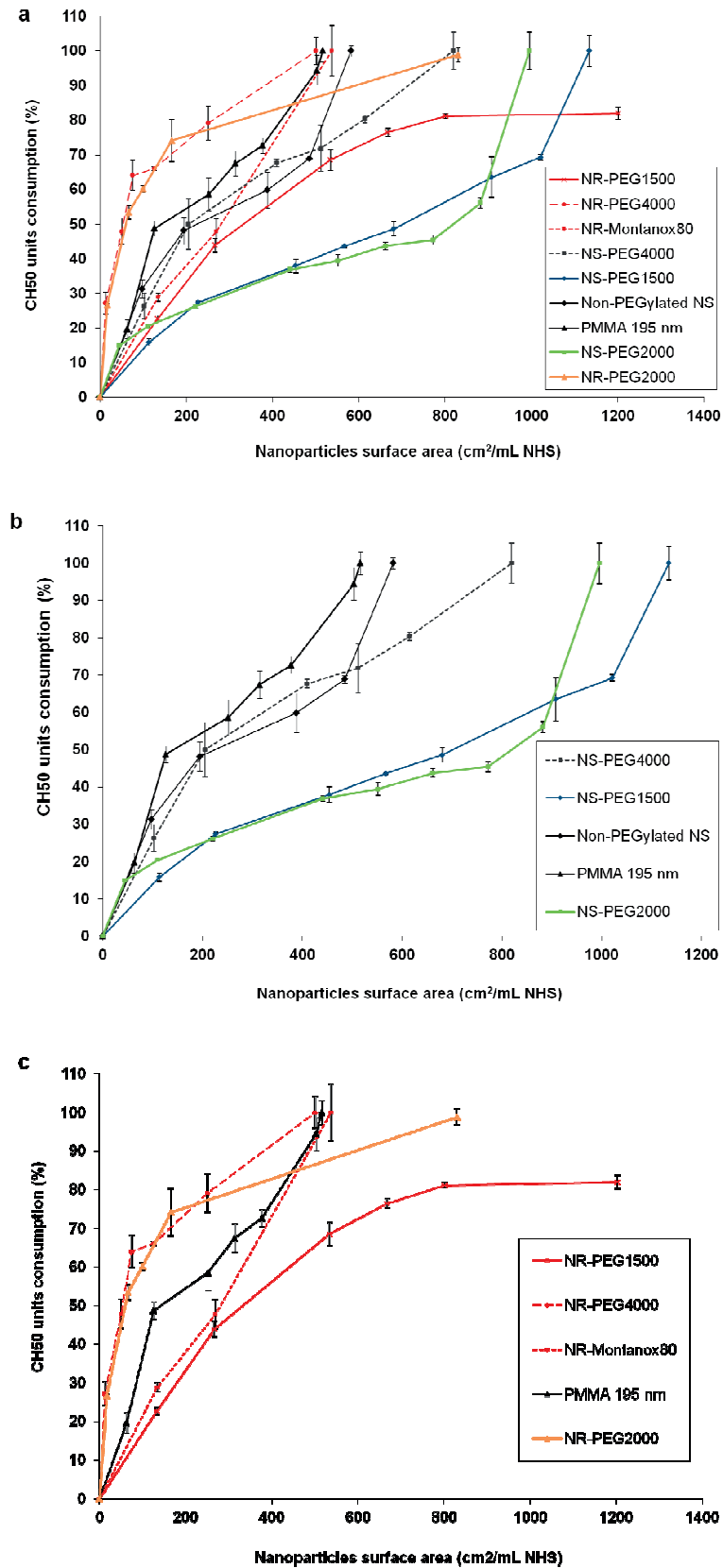


Fig. 3. Consumption of CH50 units in the presence of (a) γ -CD-C₁₀ unloaded nanoparticles such as (b) nanoreservoirs and (c) nanospheres as function of surface area. PMMA particles were used as control.

In the light of these findings, it can be concluded that the complement activation properties of γ -CD-C₁₀ nanosphere systems can be better hidden by their surface decoration with PEG1500 stearate or DMPE-PEG2000.

Regarding nanoreservoir systems (Fig. 3c), formulations with PEG4000 exhibited here again a high complement activation profile and even more than the control. On the contrary to what might be expected, DMPE-PEG2000 containing nanoreservoir suspensions were also strong activators with similar complement consumption as PEG4000 coated nanoreservoirs in the range of 0-200 cm²/mL surface area (about 75 % CH50 unit consumption at 200 cm²). However nanoreservoir-systems coated with hydroxyl PEG derivatives of 1000-1500 Da displayed significant favorable complement consumption profile (2-fold lower than the previous ones at 200 cm².mL⁻¹ surface area). Indeed, at 200 cm², 35 % activation was obtained for PEG1500 containing γ -CD-C₁₀ nanoreservoir suspensions, with consumption level never superior to 82 % in the range of tested surface area 0-800 cm².mL⁻¹. 40 % activation was obtained with Montanox 80 containing nanoreservoirs at the same surface area.

The surprising high level of complement activation displayed by PEG2000 coated nanoreservoirs may be associated to the high negative zeta potential value. Although they are coated by the same PEG, the complement consumption of NR-PEG2000 and NS-PEG2000 display very large differences. Despite the increase of PEG content in nanoreservoir formulations (proportionally to the amount of building blocks implemented in relation to nanosphere formulations) and despite the neutral charge of methoxy group, PEG2000 coated nanoreservoirs exhibit more negative charge (-30 mV) than the corresponding nanospheres (-20 mV) while the zeta potential values of the other reservoir-type systems are lower than those of sphere-type system. It is known that the high charge can trigger interactions with complement proteins via the alternative pathway [21]. It could be that the hydrophobic moieties (phospholipids) of DMPE-PEG2000 was not well integrated within the core of nanoreservoirs and could be accessible to plasma-complement proteins. Consequently, they provide more interactions with opsonins compared to hydrophilic moieties of PEG1500 which are expected to be well anchored in the nanoreservoir core. Even if Mosqueira et al. [42] described that the presence of phosphate in phosphatidylethanolamine (PE) moieties of PEG used to stabilize polymer nanocapsules lead to inhibitory effect in complement activation, PE is well-known strong complement activator [25]. It believed that formulating γ -CD-C₁₀ nanoreservoirs with PEG fatty acid esters of molecular weights about 1000-1500 Da helps to increase their stealth with respect to the complement proteins.

In addition, we observed that the CH50 unit consumption was always slightly higher with particles purified on Sephadex column in comparison to those non-purified (data not shown). The passage through Sephadex gel removes some of the PEG molecules adsorbed and not anchored within the matrix of particles, including those dissolved in the aqueous dispersing phase (free PEG). This loss of PEG molecules lead to a loss of protection against protein adsorption by reducing the density of PEG on the surface of the particles, making their accessible by plasma proteins. Other authors have also observed a loss of PEG on the surface of nanoparticles generated by 24 or 48 h dialysis [32].

Beside not impairing the physical characteristics of particles, the introduction of ART in the formulation did not modify the complement consumption profile by γ -CD- C_{10} surface modified nanodevices (Fig. 4). This suggests that the drug is well integrated within the nanocarriers. The hypothesis of the existence of specific fixation sites of ART within the γ -CD- C_{10} based nanostructures has been discussed in our previous work [8].

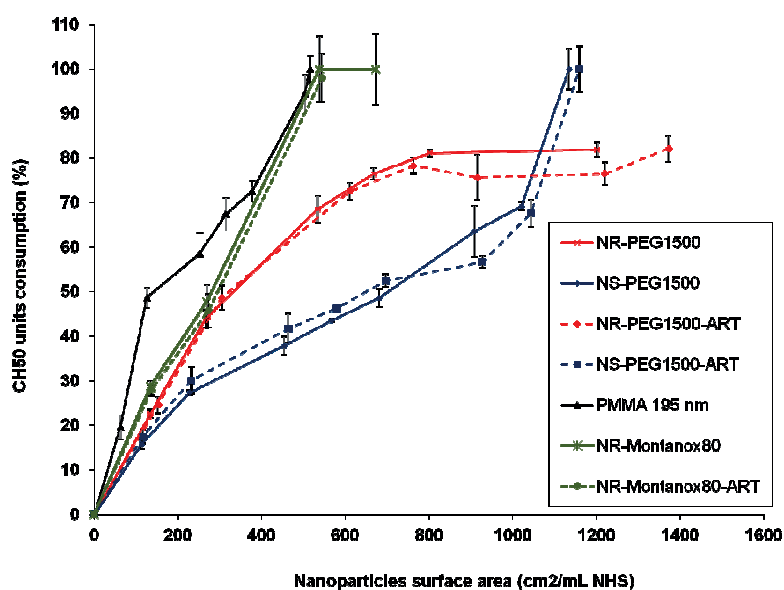


Fig. 4. Consumption of CH50 units in the presence of γ -CD- C_{10} unloaded and ART-loaded nanoreservoirs and nanospheres as function of surface area. PMMA particles were used as control.

3.4. Macrophage uptake

In order to evaluate the uptake of γ -CD- C_{10} based nanoparticles by macrophage cells, Dil dye was incorporated in the nanosphere and nanoreservoir formulations as fluorescent probe at the concentration of 7 or 20 nmol.mL⁻¹, respectively. The characteristics of Dil-loaded particles are presented in Table 3.

Table 3

Physicochemical characteristics of tested γ -CD-C₁₀ Dil-labeled nanospheres (NS) and nanoreservoirs (NR).

Formulations	Mean size (nm)	PI	ζ (mV)	Dil Content (mg.mL ⁻¹)	Density	Absolute Number/cm ³	Surface area (cm ² /cm ³)
NS-PEG4000-Dil	110	0,10	-10±2	0,01	1.096	2,67.10 ¹²	1071
NS-PEG1500-Dil	126	0,12	-15±2	0,01	1.094	2,48.10 ¹²	1239
NR-Montanox80-Dil	234	0,08	-10±2	0,032	1.070	1,15.10 ¹²	1984
NR-PEG4000-Dil	195	0,08	-6±1	0,027	1.074	1,97.10 ¹²	2352
NR-PEG1500-Dil	206	0,07	-11±1	0,025	1.069	1,69.10 ¹²	2258

The incorporation of fluorescent dye resulted in an increase in particle mean size but the zeta potential values remain unchanged. .

Prior to macrophage experiment, physical stability of Dil-loaded particles was controlled at room temperature and in aqueous electrolyte solutions. These labeled formulations exhibited good stability for at least two weeks (data not shown). Moreover, no loss of Dil from particles was detected after gel chromatography on Sephadex[®] G-75 column and after the dialysis experiment performed in pH 7.4 medium at 37 °C for two days. Indeed, dialysis experiments showed that 99 % of initially loaded Dil remained associated to the nanosystems. Subsequently, the assessment of the internalization of Dil-labeled nanocarriers by macrophage was carried out in the conditions specified below.

The quantification of *in vitro* phagocytosis capacity was carried out at 4 and 37 °C after incubating the nanoparticles (200 cm².mL⁻¹ surface area) with TPH-1 human cell cultures. The fluorescence intensity of samples incubated at 37 °C represents the total uptake including the adsorption of nanoparticles on the cell surface and active cellular endocytosis. At 4 °C, all membrane crossing systems were inhibited and the only fluorescence intensity of extracellular attached particles was determined. The influence of PEG chain length on macrophage uptake was studied. Polysorbate 80-containing nanoreservoirs did not give a significant signal at 4 °C indicating the absence of extracellular attachment with the macrophage cells (Fig. 5a). In addition, the fluorescence intensity at 4 °C was not significantly different from that at 37 °C, suggesting the absence of particle phagocytosis by macrophages. Nanosphere and nanoreservoirs stabilized by PEG1500 presented a low adsorption effect and a low phagocytosis compared to those stabilized with PEG4000 (Fig. 5a and 5b). Indeed, the extracellular adsorption as well as the macrophage uptake of PEG4000-coated nanocarriers were very higher (2 or 3-fold for nanospheres or nanoreservoirs, respectively) than those of the corresponding PEG1500-decorated nanosystems.

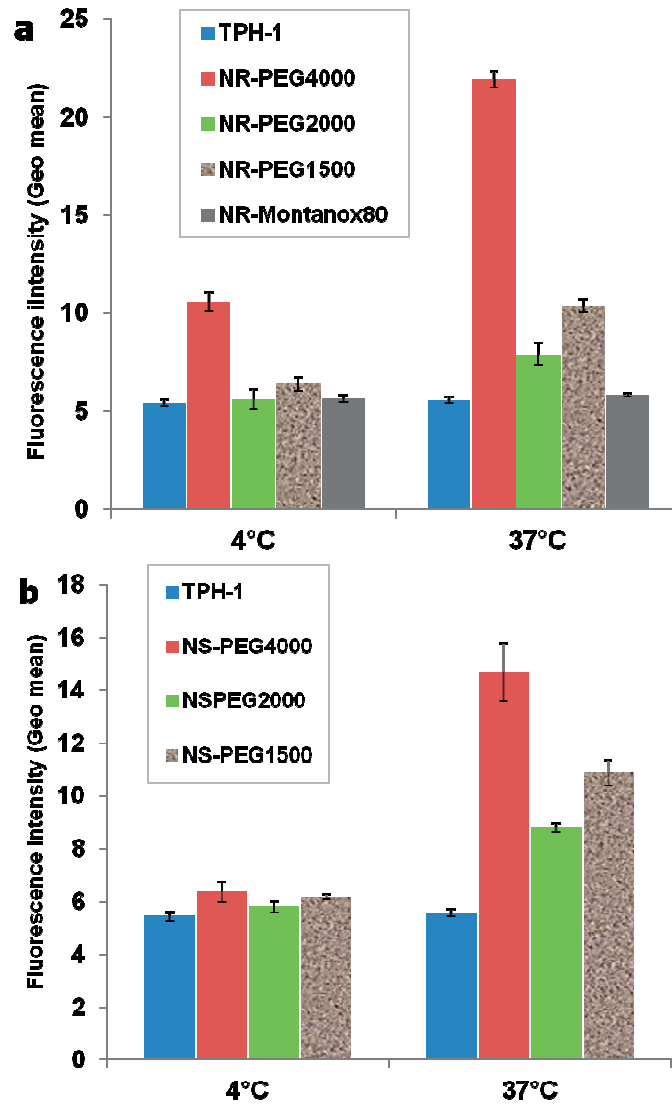


Fig. 5. *In vitro* macrophage uptake of Dil-labeled γ -CD-C10 nanoreservoir (a) and nanosphere (b) at 4°C and 37°C, mean \pm SD ($n = 3$).

In agreement with the CH50 test, the presence of PEG4000 chains on the surface of particles had an important phagocytosis effect while the presence of PEG1500 moieties significantly reduced the phagocytosis activity. The surface properties of particles also had a great impact of macrophage internalization. Moghimi *et al.* [15] demonstrated that longer PEG chains could accentuate the phagocytosis by macrophages. It is known that hydrophilic and cationic surface modification can contribute to reduce phagocytosis [21, 26]. In our case, the impact of this decrease is particularly important with Montanox 80 and PEG1500-decorated particles, despite their negative charge. However, although PEG1500-coated particles results in a lower capture by macrophage in comparison to PEG4000 chains, it should be noted that the level of phagocytosis remains slightly higher for nanospheres as well as nanoreservoirs stabilized by PEG1500 stearate as compared to the controls. Indeed, the phagocytosis of some PEG-modified nanoparticles by macrophage cells via an opsonin-

independent mechanism was described and was also implied in the recognition of long-chain fatty esters [25].

On the other hand, TPH-1 cells viability was not significantly affected after 24 h incubation with γ -CD- C_{10} nanosuspensions. Indeed, less than 15 % cell death was observed for all formulations, with respect to the untreated cells. These results point out the non-toxic character of formulations used within the concentration used close to the administration used in vivo.

3.5. Biodistribution

An in vivo study by fluorescence imaging was performed for a reliable evaluation of the biodistribution of PEGylated nanoparticles. The incorporation of fluorescent tracers, particularly near infra-red (NIR) organic dyes (optical longer wavelengths ranging from 650 to 900 nm) into the nanosystem was required. Indeed, biological tissues are relatively transparent in this spectral region. Imaging in the NIR spectrum maximizes tissue penetration and minimizes the autofluorescence of organs [27-31]. Consequently DiD dye ($\lambda_{\text{ex}} = 643$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 669$ nm) was used at the concentration of 3 nmol.mL^{-1} in this investigation.

Here again, the loading with DiD dye, slightly increased the particle mean sizes, but did not alter their zeta potential. As can be seen in the TEM image of negatively stained preparation (Fig. 6), DiD-loaded γ -CD- C_{10} nanosphere suspensions containing PEG exhibited faceting morphology as previously been shown and correlated to the presence of PEG chains on the surface of particles [8].

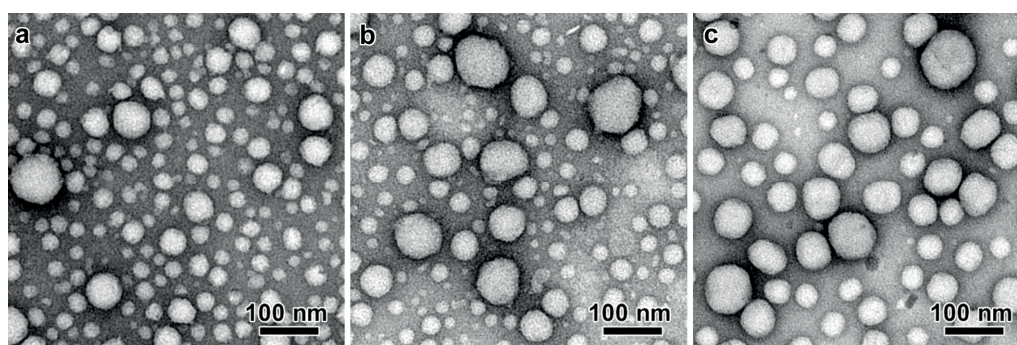


Fig. 6. TEM images of negatively stained DiD-labeled γ -CD- C_{10} nanoparticles surface-coated with PEG1500 stearate (a), DMPE-PEG2000 (b) and PEG4000 stearate (c).

The dialysis experiments showed that DiD is not released from nanoparticles due to the very lipophilic properties of carbocyanine dyes.

Owing to their physicochemical stability at ambient conditions and in electrolyte medium, DiD-loaded γ -CD- C_{10} surface modified nanoparticles were used for the *in vivo* fate tracking.

After intravenous administration of 200 μ L of DiD-loaded nanosphere or nanoreservoir suspensions to nude mice, fluorescence imaging was performed to visualize and compare the biodistribution of these nanocarriers. Fluorescence imaging provides semi-quantitative estimation of the bio-fate of nanoparticles such as the circulation times in mice as well as the way and time of elimination [27]. Prior to injection of preparations, the whole-body of mice was first scanned to determine the autofluorescence of organs (Fig. 7). Semi-quantification of the fluorescence intensities in each organ after the injection of nanoparticulate preparations was then correlated to their autofluorescence. Mice were filmed for 15 min following injection in order to determine the first pass effects of each surface-modified nanoparticle.

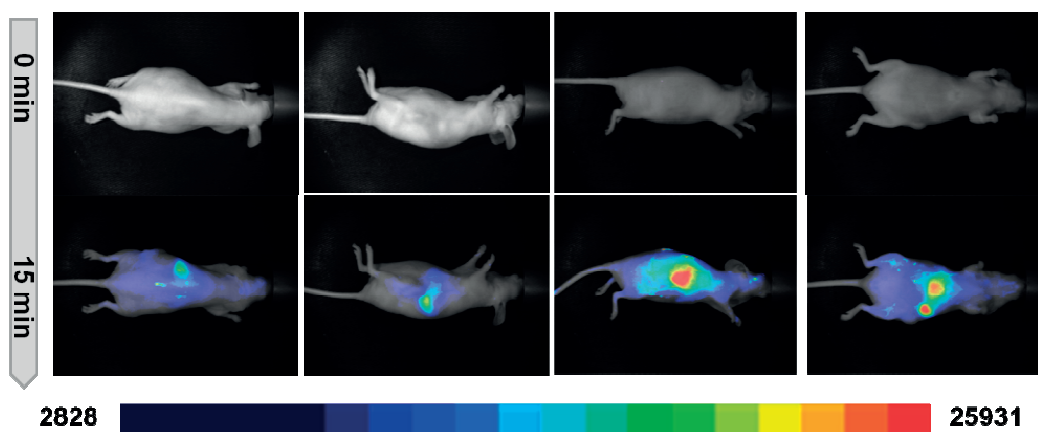


Fig. 7. Fluorescence reflectance on mouse before (auto-fluorescence, 0 min) and 15 min after intravenous injection of polysorbate 80 containing nanoreservoirs. Imaging on mouse back, left side, right side and belly.

A fluorescence signal was detected in the liver and spleen very soon after the intravenous injection of the nanoparticulate suspensions, but these particles present different biodistribution profiles. All preparations containing PEG4000 (nanospheres and nanoreservoirs) were quickly captured mainly by liver and spleen in the first minute following injection. Fluorescence signal was found in the vascular system in animals administered with the particles coated with PEG1500 and nanoreservoir systems containing PEG2000. This signal vanished about 5 min after accumulating in the liver and spleen. For these formulations (NR-PEG4000, NS-PEG4000, NR-PEG1500, NS-PEG1500 and NR-PEG2000), no signal was observed in the blood stream from the fluorescence images taken 15 min after the injection. Figure 8 represents the biodistribution of γ -CD- C_{10} nanoparticles coated by PEG2000 or Montanox 80 at various time intervals after the intravenous administration to

NMRI nude mice. It appears that NR-PEG2000 totally accumulated mainly in the liver and spleen from the first 15 min (Figure 8a). However, in the cases of PEG2000-decorated nanospheres and polysorbate 80-containing nanoreservoirs, fluorescence signals were observed in the vascular compartment at 15 min and even at 1 h post injection (Fig. 7, 8b and 8c) suggesting that these particles circulate during a longer time in the blood stream. The most interesting case is that of PEG2000-decorated nanospheres for which we observed long-lasting blood fluorescence signal confirmed by plasma imaging 24 h after injection (Fig. 8d). Indeed, blood samples were taken by cardiac puncture at time 24 h and the fluorescence was determined in the plasma, whole blood and red blood cells. This evaluation showed that a certain amount of polysorbate 80-containing nanoreservoirs and particularly PEG2000-coated nanospheres remained in the bloodstream 24 h after injection (Fig. 8d). However, the fluorescence signal quantified in the plasma was twice more important for NS-PEG2000 than NR-Montanox 80. This means that the use of PEG2000 increased the plasma distribution kinetics of nanospheres within the first 15 min and maintained a higher plasma level at 24 h in comparison to other formulations. This result constituted a significant progress with respect to the those reported by Gèze *et al.* who demonstrated, by using a quantitative radiolabeling method, that non-decorated β -CD nanospheres were rapidly cleared from bloodstream about 10 min following the intravenous injection to mice [14].

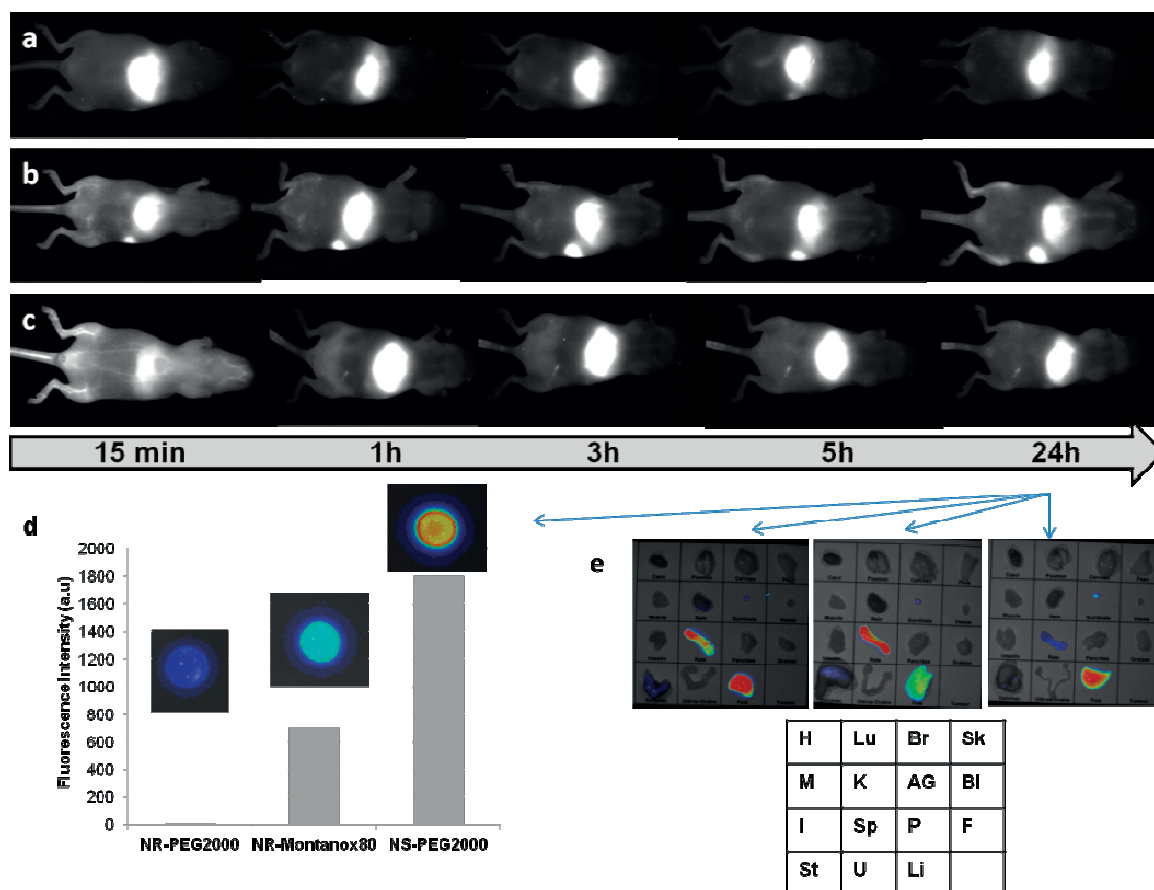


Fig. 8. *in vivo* biodistribution of γ -CD-C₁₀ surface-decorated nanoparticles after intravenous injection in nude mice by caudal vein: fluorescence images on mice belly ¼, 1, 3, 5 and 24 h after administration of PEG2000 containing nanoreservoirs (a), polysorbate 80 containing nanoreservoirs (b) and PEG2000 coated nanospheres (c); Fluorescence quantification in the plasma at T 24 h; fluorescence images of some organs at T 24 h (e).

However, it should be noted that a lot of these particles are rapidly captured by the liver and spleen as shown by the images in Figure 8a-c with a massive accumulation in these organs at 24 h (Fig. 8e). As fluorescence intensity decreases in blood, it was expected that a similar increase would be observed in the organs containing phagocyte cells (liver and spleen).

Ex vivo examination of organs 24 h after the intravenous injection confirmed that the nanoparticles accumulated in these organs which were strongly fluorescent (Fig. 8e). Indeed, *ex vivo* studies provide more detailed information about the particles accumulation in the different organs. These results confirm the nanoparticle accumulation in the MPS organs such as liver and spleen as already observed *in vivo*. As shown in Figures 8e and 9, the nanoparticles presented various tropisms depending on the nature of the nanosystem and PEG length at the surface. While NS-PEG2000 and NS-PEG4000 presented a massive accumulation of fluorescence mainly in the liver compared to the spleen, NR-Montanox80

and NS-PEG1500 presented a high level of fluorescence in both organs. This difference may be attributed to the molecular weight and PEG end-group. The predominant liver and spleen uptakes were also reported by Gèze *et al.* with non-decorated nanospheres containing ^{125}I -radiolabeled amphiphilic β -CD [14]. The fluorescence detected in the stomach (NS-PEG4000, NS-PEG1500 and NR-Montanox 80) and/or kidney (especially NR-Montanox 80) indicated that the concerning particles were degraded and excreted through feces and/or urines. Generally, the presence of particles in the lungs results from particle agglomeration caused by the adsorption of plasma proteins which is very slightly visible with PEG4000-decorated nanospheres. The very low fluorescence detected in the lungs reflects a good *in vivo* stability of the γ -CD- C_{10} particles. The bladder, heart, ovaries, uterus, skin, brain, muscle, fat and pancreas were also very slightly fluorescent 24 h after the injection.

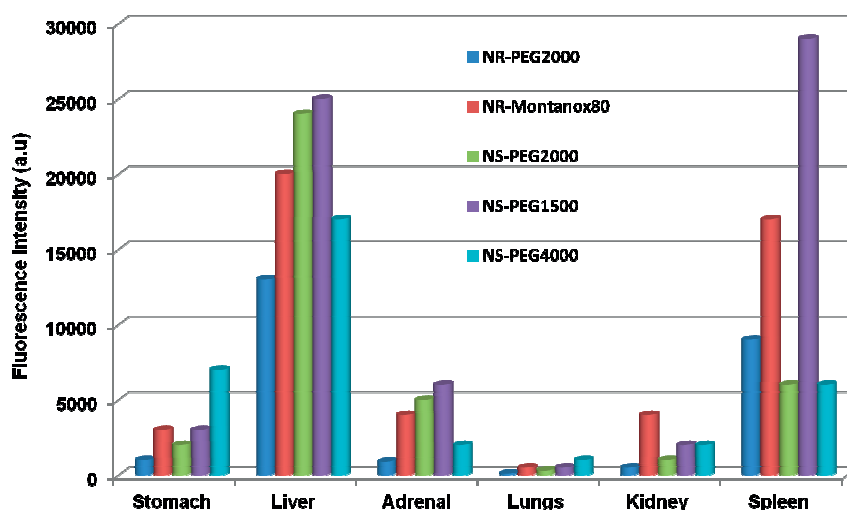


Fig. 9. Distribution of γ -CD- C_{10} surface-decorated nanoparticles in the main organs 24 hours after intravenous administration.

For all tested formulations, no fluorescence signal was observed in lymph nodes, excepted the NS-PEG1500 formulation for which a slight signal was visible in the mesenteric.

This experiment unambiguously confirmed the results of the *in vitro* study. It demonstrated the positive effect of PEG2000 and polysorbate 80 on the biodistribution of nanospheres and nanoreservoirs, respectively. The coating by PEG2000 chains limited the complement activation and the uptake by the resident phagocytes in the liver and particularly in the spleen. Owing to the steric protection, the PEG chains reduced the adsorption of plasma proteins onto the surface of the nanoparticles which occurred when particles were injected into the blood stream. The effect of PEG chains on the vascular residence and biodistribution

strongly depends on PEG chain lengths, the charge and density of PEG moieties on the particle surfaces. As has been demonstrated in several literature studies, a molecular weight of 2000 Da seems to be a limit below which the effect of steric repulsion does not play correctly [31, 36, 40].

Despite a very significant reduction of *in vitro* plasma-complement activation, PEG1500 chains did not efficiently improve blood circulation properties, probably due to the occurrence of macrophage uptake. However, a significant reduction of the uptake by macrophage cells close to zero correlated with low complement protein consumption at the concentration used *in vivo* (40 % of CH50 unit consumption) could explain the prolonged blood circulation time observed with NR-Montanox 80. The uptake of polysorbate 80-coated nanoreservoirs by liver may be mediated by the size-dependant uptake pathway via the complement systems.

Although PEGylation seems to induce a prolonged blood circulation of DMPE-PEG2000 and polysorbate 80 particles, it does not prevent the liver uptake of these nanoparticles. The blood residence time of nanoreservoirs containing polysorbate 80 was lower than DMPE-PEG2000-coated nanospheres since the nanoreservoir system contained larger particles with lower zeta potential value and displayed a higher level of protein adsorption *in vitro* than the nanosphere formulation.

4. Conclusion

In the present work, surface-modified nanoparticles were prepared by co-nanoprecipitation of bioesterified γ -CD-C₁₀ and amphiphilic PEGylated derivatives. The formulations were evaluated *in vitro* as well as *in vivo* for their haemolytic and stealthy performance. We demonstrated that decorating the surface of γ -CD-C₁₀ based nanospheres and nanoreservoirs by DMPE-PEG2000 and polysorbate 80, respectively, provides good protection against plasma proteins, improves the blood circulation of these nanoparticles within the first 15 min and maintains a higher plasma level at 24 h, especially for PEG2000-coated nanospheres. This work also provides further encouragement to investigate the co-nanoprecipitation of amphiphilic CD molecular entities with PEO derivatives as interesting way to prolong the blood circulation of bioesterified γ -CD-C₁₀ nanocarriers. These results suggest that surface-decorated γ -CD-C₁₀ nanoparticles may further favor delivery of ART. Taken together, these findings provide new perspectives for systemic administration of ART in malaria therapeutic. The nanocarriers as well as ART plasma kinetics studies are in progress.

Acknowledgments

The authors thank Christine Brunet-Manquat and Delphine Levilly (DPM) as well as Nolwenn Lautram and Jérôme Bejaud (INSERM U646-Angers) for their technical assistance. We also thank the French Embassy in Burkina Faso for the financial support of J.B.G. Yaméogo.

References

- [1] World Health Organization (WHO), The use of antimalarial drugs: Report of a WHO Informal consultation 13-17 november 2001 (WHO/CS/RBM/2001.33).
- [2] M.E. Van Agtmael, T.A. Eggelte, C.J. van Boxtel, Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication, *TiPS* 20 (1999) 199-205.
- [3] J.W. Wong, K.H. Yuen, Inclusion complexation of artemisinin with α -, β - and γ -cyclodextrins, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29 (2003) 1035-1044.
- [4] J.W. Wong, K.H. Yuen, Improved oral bioavailability of artemisinin through inclusion complexation β - and γ -cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* 227 (2001) 177-185.
- [5] N.G. Sahoo, A. Abbas, Z. Judeh, C.M. Li, K-H. Yuen, Solubility enhancement of poorly water-soluble antimalarial drug: experimental design and use of a modified multifluid nozzle pilot spray drier, *J. Pharm. Sci.* 98(1) (2009) 281-296.
- [6] B. Isacchi, S. Arrigucci, G. la Marca, M.C. Bergonzi, M.G. Vannucchi, A. Novelli, A.R. Bilia, Conventional and long-circulating liposomes of artemisinin: preparation, characterization, and pharmacokinetic profile in mice., *J. Liposome Res.* 21(3) (2011) 237-244.
- [7] B. Isacchi, M.C. Bergonzi, M. Grazioso, F. Righeschi, A. Pietretti, C. Severini, A.R. Bilia, Artemisinin and artemisinin plus curcumin liposomal formulations: Enhanced antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei*-infected mice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2011), In press.
- [8] J.B.G. Yaméogo, A. Gèze, L. Choisnard, J-L. Putaux, A. Gansané, S.B. Sirima, R. Semdé, D. Wouessidjewe, Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers. I: Formulation, lyoavailability and *in vitro* antimalarial activity assessment, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2012) doi:10.1016/j.ejpb.2011.12.007.
- [9] L. Choisnard, A. Gèze, C. Vanharverbeke, J.B.G. Yaméogo, J-L Putaux, B. Brasme, L. Julien, S. Boulanger, C. Elfakir, D. Wouessidjewe, Physicochemical characterization of α -, β - and γ -cyclodextrins bioesterified with decanoate chains used as building blocks of colloidal nanoparticles, *Biomacromolecules* 12(8) (2011) 3031-3038.
- [10] L. Choisnard, A. Gèze, J-L. Putaux, Y.S. Wong, D. Wouessidjewe, Novel nanoparticles of β -cyclodextrin esters obtained by self-assembling of bio-transesterified β -cyclodextrins, *Biomacromolecules* 7 (2006) 515-520.
- [11] L. Choisnard, A. Gèze, B.G.J. Yaméogo, J-L. Putaux, D. Wouessidjewe, Miscellaneous nanoaggregates made of CD esters synthesised by an enzymatic pathway, *Int. J. Pharm.* 344 (2007) 26-32.
- [12] A. Gèze, L. Choisnard, J-L. Putaux, D. Wouessidjewe, Colloidal systems made of biotransesterified cyclodextrins grafted with C10 alkyl chains, *Mater. Science Eng. C* 29 (2009) 458-462.
- [13] P. Couvreur, C. Vauthier, Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease, *Pharm. res.* 27(7) (2006) 1417-1450.
- [14] A. Gèze, L. Tieu Chau, L. Choisnard, J.P. Mathieu, D. Marti-Battle, L. Riou, J-L. Putaux, D. Wouessidjewe, Biodistribution of intravenously administrated amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres, *Int. J. Pharm.* 344 (1-2) (2007) 135-142.
- [15] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory and practice, *Pharmacol. Rev.* 53 (2001) 283-318.
- [16] S.M. Moghimi, J. Szebeni, Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties, *Progress Lipid Res.* 42 (2003) 463-478.
- [17] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J-P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials* 27 (24) (2006) 4356-4373.
- [18] C. Passirani, G. Barrat, J.P. Devissaguet, D. Labarre, Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system, *life sciences*, 62(8) (1998) 775-785.
- [19] C. Vauthier, C. Schmidt, P. Couvreur, Measurement of the density of polymeric nanoparticulate drug carriers by isopycnic centrifugation, *J. Nanopart. Res.* 1 (1999) 411-418.
- [20] B.A. Avery, K.K. Venkatesh, M.A. Avery, Rapid determination of artemisinin and related analogues using high-performance liquid chromatography and an evaporative light scattering detector, *J. chromat. B* 730 (1999) 71-80.
- [21] M. Morille, T. Montier, P. Legras, N. Carmoy, P. Brodin, B. Pitard, J.P. Benoit, C. Passirani, Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting, *Biomaterials* 31(2) (2010) 321-329.
- [22] E. Garcion, A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei, J.P. Benoit, A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats, *Mol. Cancer Ther.* 5(7) (2005) 1710-1722.

- [23] M. Hanauer, S. Pierrat, I. Zins, A. Lottz, C. Sonnichsen, Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape, *Nono Lett.* 7(9) (2007) 2881-2885.
- [24] A. Béduneau, P. Saulnier, N. Anton, F. Hindré, C. Passirani, H. Rajerison, N. Noiret, J.P. Benoit, Pegylated Nanocapsules Produced by an Organic Solvent-Free Method: Evaluation of their Stealth Properties, *Pharma. Res.* 23(9) (2006) 2190-2199.
- [25] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. Leroux, J.P. Benoit, Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake, *J. Biomed. Mater. Res. A* 78(3) (2006) 620-628.
- [26] A. Paillard, C. Passirani, P. Saulnier, M. Kroubi, E. Garcion, J.P. Benoit, D. Betbeder, Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as stealth cationic nanocarriers, *Pharm. Res.* 27(1) (2009) 126-133.
- [27] L. Sancey, S. Dufort, V. Joserand, M. Keramidas, C. Righini, C. Rome, A.C. Faure, S. Foillard, S. Roux, D. Boturyn, O. Tillement, A. Koenig, J. Boutet, P. Rizo, P. Dumy, J.L. Coll, Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 309-316.
- [28] I. Texier, M. Goutayer, A. Da Silva, L. Guyon, N. Djaker, V. Josserand, E. Neumann, J. Bibette, F. Vinet, Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved *in vivo* fluorescence imaging, *J. Biomed. Optics.* 14(5) 054005 (2009) 1-11.
- [29] S. Dufort, L. Sancey, C. Wenk, V. Josserand, J.L. Coll, Optical small animal imaging in the drug discovery process. *Biochim. Biophys. Acta* 1798(12) (2010) 2266-2273.
- [30] M. Goutayer, S. Dufort, V. Josserand, A. Royère, E. Heinrich, F. Vinet, J. Bibette, J.L. Coll, I. Texier, Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by *in vivo* fluorescence imaging, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75(2) (2010) 137-47.
- [31] A.C. Faure, S. Dufort, V. Josserand, P. Perriat, J.L. Coll, S. Roux, O. Tillement, Control of the *in vivo* biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings, *Small* 5 (2009) 2565-2575.
- [32] A. Vonarbourg, P. Saulnier, C. Passirani, J.P. Benoit, Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface, *Electrophoresis* 26 (2005) 2066-2075.
- [33] E. Bilensoy, O. Gurkaynak, A.L. Dogan, A.A. Hincal, Safety and efficacy of amphiphilic beta-cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery, *Int. J. Pharm.* 347 (2008) 163-170.
- [34] F. Quaglia, L. Ostacolo, A. Mazzaglia, V. Villari, D. Zaccaria, M.T. Sciortino, The intracellular effects of non-ionic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles in the delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 30 (2009) 374-382.
- [35] E. Memisoglu-Bilensoy, A.L. Dogan, A.A. Hincal, Cytotoxic evaluation of injectable cyclodextrin nanoparticles, *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 585-589.
- [36] R. Grief, M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blank, R. H. Muller, Stealth corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of corona (PEG chain length and surface density) and the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids Surf. B* 18 (2000) 301-313.
- [37] M. Harboe, E.B. Thorgersen, T.E. Mollnes, Advances in assay of complement function and activation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 976-987.
- [38] S.M. Moghimi, A.J. Andersen, D. Ahmadvand, P.P. Wibroe, T.L. Andresen, A.C. Hunter, Material properties in complement activation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 1000-1007.
- [39] N.T. Huynh, E. Roger, N. Lautram, J.P. Benoit, C. Passirani, The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: passive versus active targeting, *Nanomedicine* 5 (9) (2010) 1415-1433.
- [40] M. Vittaz, D. Bazile, G. Spenlehauer, T. Verrecchia, M. Veillard, F. Puisieux *et al.*, Effect of PEO surface density on long circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators, *Biomaterials* 17 (1996) 1575-1581.
- [41] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, Capture of stealth nanoparticles by body's defences, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 18 (2001) 527-550.
- [42] V.C. Mosqueira, P. Legrand, A. Gulik, O. Bourdon, R. Gref, D. Labarre *et al.*, Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules, *Biomaterials* 22 (2001) 2967-2979.

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse vise à développer une forme injectable d'ART pour la prise en charge du paludisme grave. Plus spécifiquement, il s'agit de mettre au point des formes vectorisées d'ART à travers son association à des suspensions colloïdales de CDs modifiées, cette approche devant permettre d'optimiser l'efficacité thérapeutique de l'ART.

Afin de répondre à cet objectif, les activités de recherche ont été réalisées en trois étapes.

Un travail de pré-formulation visant à développer les méthodes analytiques de dosage de l'ART et à déterminer les solubilités et la stabilité de l'ART dans différents milieux a été réalisé dans un premier temps.

Dans la deuxième partie de notre travail, les formulations de suspensions colloïdales de nanosphères et de nanoréservoirs associant l'ART ont été entreprises. Pour ce faire, des dérivés de CDs bioestérifiées et d'autres matériaux convenablement choisis, compatibles avec l'administration parentérale, ont été mis en œuvre, notamment certains dérivés amphiphiles polyoxyéthylénés. Les nanosystèmes chargés ou non d'ART ont été ensuite caractérisés sur le plan physico-chimique, morphologique et structural. La lyodisponibilité de l'ART à partir des vecteurs colloïdaux a également été évaluée.

Enfin, dans la troisième partie, l'efficacité et la sécurité d'emploi des nouvelles formes galéniques proposées ont été évaluées à travers des tests biologiques *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, des essais *in vitro* d'efficacité sur cultures de *Plasmodium*, de toxicité vis-à-vis des érythrocytes et de comportement vis-à-vis du système des phagocytes mononucléés (protéines du complément sérique et macrophages) ont été mis en œuvre. La biodistribution des nanovecteurs chez l'animal ainsi que le profil pharmacocinétique de l'ART associée ont permis de compléter les études réalisées *in vitro*.

Tous les résultats obtenus sont résumés et discutés ci-après, en incluant des résultats récents n'ayant pas encore fait l'objet de publication.

1. Formulation et caractérisations physico-chimiques et pharmacotechniques des systèmes nanoparticulaires

La stratégie envisagée dans ce travail est basée sur l'élaboration de suspensions colloïdales de nanoparticules à base de cyclodextrines amphiphiles obtenues par voie de synthèse enzymatique.

Cette thématique s'inscrit dans la dynamique de recherche de l'Equipe Nanoparticules et Vectorisation (ENANOV)/Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'UFR de Pharmacie/Université de Grenoble 1. Un article de revue bibliographique présenté dans la première partie de ce manuscrit décrit l'historique du travail déjà réalisé sur ce sujet.

Dans le cadre de notre travail, ce sont des esters d'acide gras (longueur de chaîne C₁₀) et d' α -, β - et γ -CD, modifiées sur la face secondaire, qui ont été mis en œuvre. Les CDs modifiées sont synthétisées au laboratoire par transestérification de la CD en présence de décanoate de vinyle. La réaction est catalysée par une métallo-enzyme, la thermolysine immobilisée sur célite. Nous avons utilisé cette voie de synthèse biocatalysée car elle est simple et conduit à des rendements quantitativement élevés. Egalement, les principaux paramètres de synthèse, actuellement mieux maîtrisés dans notre équipe, permettent entre autres d'obtenir des produits de pureté convenable (Choisnard *et al.* 2006, 2007, 2011). La technique de synthèse par voie enzymatique est décrite en annexe 5.

Les dérivés ainsi obtenus ont démontré une capacité d'auto-organisation sous la forme de structures nanométriques dans les conditions standard de nanopréciipitation (Choisnard *et al.* 2007, Gèze *et al.* 2009).

Outre la vérification de la capacité des dérivés à générer des particules submicroniques, nous avons cherché à corrélérer la capacité d'auto-association aux propriétés physico-chimiques des dérivés de cyclodextrines.

Dans ce cadre, une caractérisation plus fine des produits biosynthétisés a été conduite. En particulier, une méthode analytique à partir des données de CLHP, de RMN et de spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF a été développée et validée (Choisnard *et al.* 2011). Cette approche analytique permet une lecture directe des proportions relatives des espèces de degré de substitution différent au sein d'un même produit. Ces données donnent accès à des caractéristiques telles que le taux de substitution moyen, la masse molaire moyenne, la polydispersité des espèces dans d'échantillon et la valeur de HLB moyen. La méthode CLHP permet également d'accéder au pourcentage de conversion du décanoate de vinyle et donc d'apprécier l'efficacité de la synthèse (Choisnard *et al.* 2011).

Cette approche analytique est appliquée sur les dérivés de CD bioestérifiées mis en œuvre dans le cadre de ce travail de thèse. Le tableau I résume les principales caractéristiques des produits synthétisés.

Tableau I : Caractéristiques des dérivés de CD bioestérifiées.

Produits synthétisés	% de conversion du décanoate de vinyle (IC)	Taux de substitution moyen/CD (IC)	Mw moyenne des esters de CD en g.mol ⁻¹ (IC)
α-CD-C ₁₀	97,8 (97,25-98,31)	4,4 (4,39-4,44)	1652,8 (1649,1-1656,5)
β-CD-C ₁₀	96,6 (95,67-98,65)	7,6 (6,54-8,22)	2314,3 (2065,9-2663,2)
γ-CD-C ₁₀	66,5 (49,28-83,8)	9,2 (6,81-11,59)	2713,9 (2346,4-3081,3)

IC = Intervalle de Confiance, CD = Cyclodextrine

Le spectre de masse MALDI-TOF du dérivé γ-CD-C₁₀ est illustré dans la figure 1. Ce dérivé présente des espèces de degré de substitution variant de 6 à 11 avec le signal le plus intense attribué aux espèces à 8 acylations.

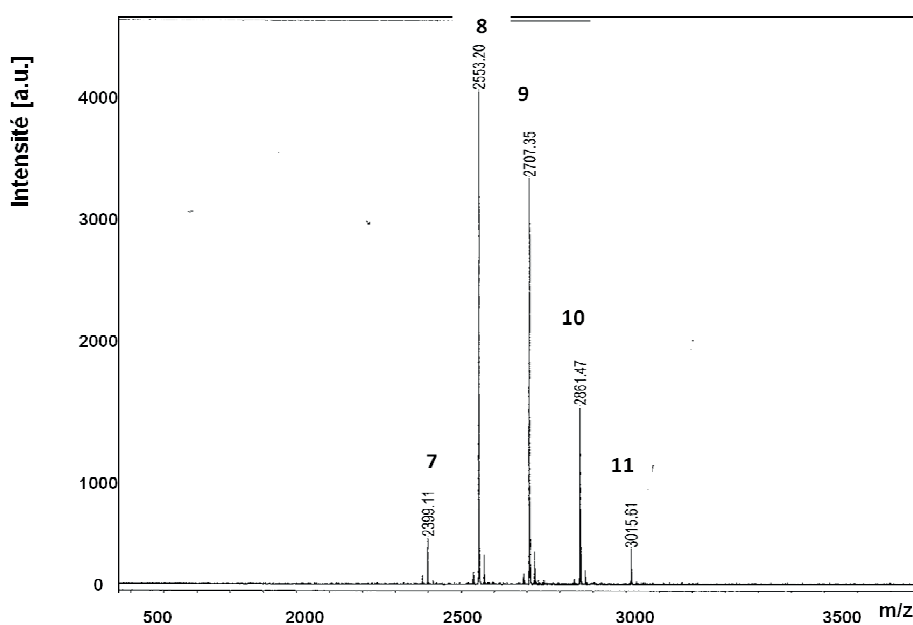


Figure 1 : Spectre de masse MALDI-TOF du dérivé γ-CD-C₁₀. Les nombres au-dessus des pics indiquent les valeurs m/z + Na⁺. Les pics sont séparés les uns des autres par une unité de masse (154 g.mol⁻¹) correspondant à la masse molaire d'une chaîne décanoate. Pour chaque valeur m/z, le nombre de chaînes greffées correspondant est indiqué en caractère foncé.

Les dérivés β-CD-C₁₀ et α-CD-C₁₀ synthétisés présentent des taux de substitution variables de 4 à 8 et de 2 à 6 acylations, respectivement.

Le procédé de nanoprécipitation ou déplacement de solvant a été mis en œuvre pour élaborer les nanosystèmes à base de dérivés α -, β et γ -CD- C_{10} . Ce procédé est retenu pour sa mise en œuvre aisée, mais également du fait que sa transposition à l'échelle industrielle est tout à fait envisageable (Fessi *et al.* 1986, 1989, Vauthier *et al.* 2009). Par ailleurs, la nanoprécipitation qui est largement appliquée à de nombreux matériaux à l'instar des polymères, fait appel à des solvants organiques miscibles à l'eau, à faible potentiel toxique (solvant de classe III). L'acétone et l'éthanol sont les deux solvants les plus couramment utilisés (Wehrle *et al.* 1995). Un schéma descriptif de la technique de nanoprécipitation est présenté figure 2.

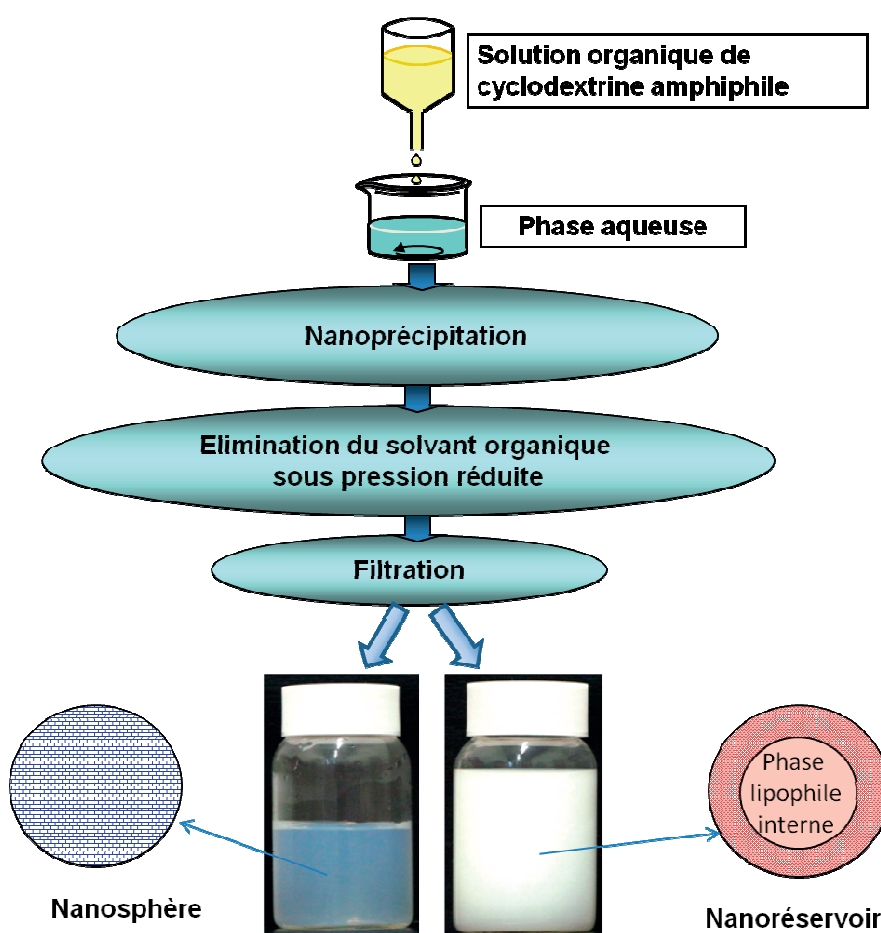


Figure 2 : Schéma de la technique de nanoprécipitation.

Selon les conditions expérimentales de nanoprécipitation, les dérivés des séries α -CD- C_{10} , β -CD- C_{10} et γ -CD- C_{10} donnent lieu à la formation des deux principales architectures supramoléculaires que sont les nanosphères et les nanoréservoirs.

Concernant les structures nanosphères, l'influence de la nature de la CD (α , β ou γ) et de la concentration initiale en CD a d'abord été examinée. Deux types de formulations,

préparées avec des concentrations de CD dans la phase organique de 1 ou de 2 mg/mL ont été réalisés et comparés. Le tableau II montre que la nature du dérivé de CD mis en œuvre (α -, β - ou γ -CD-C₁₀) influence de manière significative les caractéristiques granulométriques des nanoparticules. Les tailles moyennes mesurées par diffusion quasi-élastique de la lumière varient entre 85 et 110 nm. Les plus grandes tailles sont obtenues pour les dérivés α -CD-C₁₀. En revanche, la concentration de CD dans la phase organique n'a pas d'effet significatif sur la taille des particules.

Tableau II : caractéristiques des nanosphères blanches (sans ART) préparées avec deux lots de synthèse différents de dérivés de α -, β - et γ -CD-C₁₀

Type d'ester de CD	α -CD-C ₁₀		β -CD-C ₁₀		γ -CD-C ₁₀	
Lot de synthèse	A	B	A	B	A	B
Formulation I = 1mg CD/mL d'acétone						
diamètre moyen (nm, n=3)	109±8	106±4	100±3	98±9	87±5	85±8
IP moyen (n=3)	0,14	0,18	0,06	0,06	0,06	0,04
Formulation II = 2 mg CD/mL d'acétone						
Diamètre moyen (nm, n=3)	110±7	109±3	102±6	104±6	89±4	88±5
IP moyen (n=3)	0,08	0,1	0,06	0,04	0,04	0,09

IP = Indice de Polydispersité (population jugée homogène pour IP < 0,25), SD= déviation standard

Les structures nanoréservoirs présentent un cœur liquide lipophile entouré d'une couronne de CD modifiées généralement associées à des molécules tensioactives stabilisantes (Fessi *et al.* 1986, Skiba *et al.* 1992, Memisoglu *et al.* 2002, Gèze *et al.* 2009). Dans ces systèmes, le principe actif associé sera majoritairement contenu dans la phase lipophile interne. Le choix de la nature de la phase lipophile est étroitement lié à sa capacité à solubiliser le maximum de principe actif. Des études préliminaires de solubilité de l'ART dans différentes phases lipophiles (détaillées en annexe 2) ont orienté notre choix vers l'utilisation du benzoate de benzyle. En effet, les résultats issus de ces études montrent que l'ART est environ quatre fois plus soluble à 25 °C dans le benzoate de benzyle (83,30 mg/mL) que dans les triglycérides à chaînes moyennes comme le Miglyol® 812 N (23,10 mg/mL). De plus, les résultats de l'étude de stabilité montrent que l'ART est chimiquement stable dans le benzoate de benzyle à la température ambiante et à 4°C pendant au moins soixante jours (cf annexe 3). Nous avons montré que les suspensions de type nanoréservoir CD/benzoate de benzyle/ART peuvent être conservées indifféremment à la température ambiante ou au réfrigérateur, pendant un mois au moins, sans risque majeur de dégradation du principe actif.

Après le choix de la phase lipophile interne, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'influence de la nature du couple de tensioactif lipophile/hydrophile utilisé, sur les caractéristiques granulométriques et la stabilité colloïdale des nanoréservoirs. Les

couples de tensioactifs lipophile/hydrophile testés sont : Montane[®] 80/ Montanox[®] 80, Montane[®] 80/ Solutol[®] HS15 (mélange de polyéthylène glycol 660 et de 12-hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660), lécithine de soja/ Montanox[®] 80 et lécithine de soja/ Solutol[®] HS15. Toutes ces molécules amphiphiles sont bien connues pour leur utilisation dans les préparations de structures nanoréservoirs (Heurtault *et al.* 2002, Weisse *et al.* 2009). Pour cette étude, nous avons utilisé une formulation conventionnelle décrite par ailleurs (Gèze *et al.* 2009).

Les résultats obtenus montrent que tous les couples de tensioactifs permettent l'obtention de nanoparticules de tailles comprises entre 120 et 180 nm. Les tailles d'environ 120 nm, sont obtenues avec les formulations utilisant le solutol[®] HS15 comme tensioactif hydrophile. Cependant, la dispersion des particules dans ces suspensions n'est pas homogène (IP > 0,25). En revanche, les particules de 180 nm obtenues avec le couple de tensioactif Montane[®] 80/ Montanox[®] 80 (80 mg/80 mg) apparaissent plus homogènes (IP ≤ 0,25).

La lécithine de soja, peu soluble à température ambiante dans l'acétone, requiert l'utilisation d'éthanol lors des études de nanoprecipitation. Dans les autres formulations, l'acétone est utilisée comme solvant organique. Une autre étude réalisée avec le couple Montane[®] 80/ Montanox[®] 80, montre que les particules obtenues sont plus petites et plus homogènes lorsque l'acétone est utilisée comme solvant, comparées à celles obtenues en présence d'éthanol.

Par la suite, l'effet de l'augmentation de la quantité de phase lipophile interne des nanoréservoirs (de 200 à 400 µL) a été évalué en mettant en œuvre le couple Montane[®] 80/ Montanox[®] 80. Les caractéristiques des particules obtenues permettent de conclure que l'utilisation d'une plus grande quantité de benzoate de benzyle (400 µL) entraîne une augmentation de la taille des particules qui passent de 180 à 250 nm environ, qui restent toutefois homogènes (IP = 0,17). Après une semaine de conservation à la température ambiante, un dépôt de particules est cependant observé.

Enfin, dans le but d'affiner les quantités des différents constituants de la formulation, l'effet de la diminution des quantités de tensioactifs a été évalué afin d'obtenir des concentrations en polysorbate 80 compatibles avec l'administration parentérale. En effet, Memisoglu *et al.* (2006) ont démontré que la cytotoxicité des nanoparticules de CDs amphiphiles augmente avec la concentration de tensioactif utilisée. Ces auteurs ont par ailleurs mis en évidence que l'utilisation des tensioactifs à des concentrations d'environ 0,1 % (m/v) n'entraîne pas d'effet cytotoxique des formulations nanoparticulaires à base de CD modifiées (Memisoglu *et al.* 2006). Les variations du rapport tensioactif lipophile/tensioactif

hydrophile (1/1, 1/2 ou 2/1), ou du rapport de solvant organique/solution aqueuse (1/1 ou 1/2) ont été également prises en compte dans cette évaluation. La taille et la stabilité des suspensions correspondantes ont été évaluées et comparées. Ces expériences ont montré qu'il était possible d'obtenir des suspensions de nanoréservoirs (taille d'environ 200 nm) physiquement stables en diminuant la quantité de tensioactif et en augmentant la quantité de CD mise en œuvre (cf Tableau 2 Yaméogo *et al.* 2012).

Il est vraisemblable que le type de particules, nanosphère ou nanoréservoir, ainsi que la composition qualitative et quantitative des formulations conduisent à des systèmes auto-organisés de structures internes variables. La connaissance de ces structures est importante à plusieurs points de vue. Sur le plan strictement fondamental, il peut être intéressant de comprendre les mécanismes d'auto-association de ces CDs bioestérifiées. Du point de vue de l'application de ces systèmes comme transporteurs de substances actives, la résolution des structures est encore plus pertinente. Elle permet en effet de comprendre le type d'interaction et la localisation des molécules actives dans les nanosystèmes et éventuellement, le mécanisme de leur relargage. Par ailleurs, les informations sur l'ultrastructure des particules peuvent être corrélées à certaines propriétés physico-chimiques telles que la stabilité.

C'est dans ce contexte que des techniques pointues et complémentaires ont été mises en œuvre pour caractériser les nanosystèmes tant sur le plan morphologique que structural. Ces études qui sont déjà bien avancées se poursuivent. Les techniques utilisées sont essentiellement la microscopie électronique à transmission (MET) après coloration négative, la cryo-MET, la diffusion des rayons X (DRX) aux petits et grands angles (SAXS et WAXS).

Les résultats de MET après coloration négative font apparaître dans le cas des structures type sphère une variété de morphologies. Les dérivés α -CD-C₁₀ conduisent à des nano-objets en forme de tonneau (Figure 3a). Cette observation est à corrélérer à la plus grande taille des objets obtenus en diffusion quasi-élastique de la lumière. Les particules de β -CD-C₁₀ sont soit sphériques, soit polygonales (Figure 3b). Le dérivé γ -CD-C₁₀ s'auto-organise généralement en objets submicroniques de forme sphéroïdale (Figure 3c).

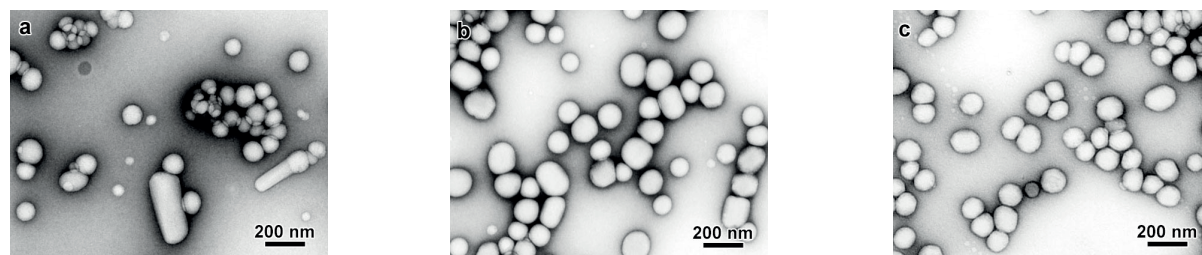


Figure 3 : Images de MET après coloration négative de nanosphères de α -CD-C₁₀ (a), β -CD-C₁₀ (b) et γ -CD-C₁₀ (c).

Les caractérisations réalisées en DRX ont révélé une variété d'organisations internes des nanoparticules en fonction des dérivés de CD. A ce stade des études réalisées, l'accumulation des données complémentaires cryo-MET/DRX permet de dégager des tendances au niveau structural. IL est notamment possible de constater une évolution de la morphologie et de l'ultrastructure des particules de β -CD-C₁₀ avec le taux de substitution du dérivé (Choisnard *et al.* 2011). En effet, les faibles taux de substitution mènent à l'obtention de particules sphériques de structure lamellaire tandis que les taux plus élevés conduisent à une forme d'objet en tonneau associée à une structure hexagonale colonnaire (Figure 4). Le changement de morphologie semble s'opérer à un degré de substitution moyen de 5.

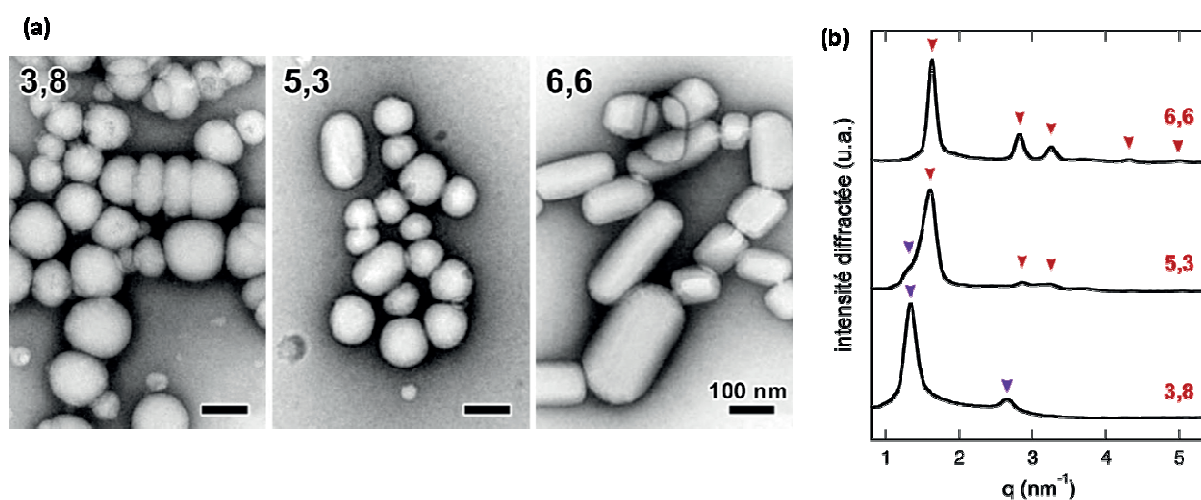


Figure 4 : Images de MET après coloration négative (a) et profils SAXS (b) de nanoparticules de β -CD-C₁₀ avec des taux de substitution différents (3,8 ; 5,3 et 6,6). Les flèches sur les profils SAXS indiquent les principaux pics de diffraction.

Les nanosphères d' α -CD-C₁₀ présentent à l'instar des β -CD-C₁₀ une structure hexagonale. En ce qui concerne les particules de γ -CD-C₁₀, différents spectres DRX ont été observés. Lorsque (rarement) trois anneaux sont observés, la structure est hexagonale. Plus souvent, les spectres présentent deux anneaux fins ou bien un anneau fin et l'autre diffus. Le rapport des diamètres (environ 1,15) n'a pas encore permis d'identifier la structure des particules de γ -CD-C₁₀. Les études couplées cryo-MET/DRX se poursuivent dans le but de déterminer l'organisation moléculaire au sein des nanoparticules encore non élucidée.

Enfin, les expériences de DRX à haute température ont mis en évidence la très bonne stabilité thermique des nanoparticules. Des capillaires scellés contenant les suspensions de nanoparticules, chauffés à des températures supérieures à 100°C, ont permis d'observer plusieurs transitions structurales. Ces transitions sont généralement réversibles si la température ne dépasse pas 130°C et irréversible au-delà de cette température (Poster

XII^{ème} Journées du Club Français des Cyclodextrines, décembre 2009). Cette bonne stabilité thermique est intéressante au regard d'une potentielle stérilisation par la chaleur, des suspensions de nanoparticules.

Concernant les systèmes nanoréservoirs, les images MET après coloration négative des suspensions montrent que les particules se déforment puis coalescent durant le séchage. La technique de coloration négative ne permet donc pas une détermination aisée de la morphologie des nanoréservoirs. En revanche, les images obtenus par cryo-MET montrent des particules individualisées et sphériques (cf Figure 7 Yaméogo *et al.* 2012).

Il est à noter que l'examen des structures nanoréservoirs en DRX n'a pas mis en évidence d'images de diffraction.

Les études de l'ultrastructure des nanosystèmes sont longues et complexes. Les travaux entrepris se poursuivent et feront l'objet de publication ultérieure.

L'ensemble de ces premiers résultats nous ont permis de démontrer la capacité d'auto-assemblage des CDs bioestérifiées (α -, β et γ -CD-C₁₀) sous la forme de nanosphères et de nanoréservoirs. Nous avons étudié un certain nombre de paramètres de formulation, permettant d'aboutir à des particules stables et de différents diamètres hydrodynamiques. Nous avons également progressé dans la connaissance de l'ultrastructure des systèmes.

Fort de ces avancées, nous avons envisagé la suite du travail sur l'optimisation de l'association de l'ART aux nanoparticules. Les paramètres étudiés sont notamment la concentration initiale en principe actif et en CD, la nature du dérivé amphiphile de CD (taille de cavité de l'oligosaccharide) et la présence ou non d'agent stabilisant.

Le taux et le rendement d'association de l'ART aux nanosystèmes sont évalués par une méthode de dosage CLHP-UV, adaptée de celle décrite par Zhao (1987) (cf annexe 1).

Une étude préliminaire a montré que la prise en charge de l'ART est plus élevée avec les formulations de nanosphères mettant en jeu une concentration initiale de γ -CD-C₁₀ de 2 mg/mL (cf Tableau 1 Yaméogo *et al.* 2012). Par la suite, nous avons essentiellement travaillé sur l'optimisation de l'association de l'ART aux particules de γ -CD-C₁₀.

Le ratio molaire ART/ γ -CD-C₁₀ de $r = 1/1$, s'est avéré compatible avec la formulation de suspensions colloïdales stables (en l'absence de tensioactifs) sur une période de plusieurs semaines. Au-delà de ce ratio molaire optimal, les études d'association mettant en jeu des ratios $r > 1$, se sont traduites à terme par une désorption d'une partie de l'ART initialement associée aux particules.

Des suspensions dosées à 0,3 mg/mL d'ART correspondant à un rendement d'association élevé (95 %) ont été préparées. L'ensemble de ces résultats conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle l'ART est fixée sur des sites spécifiques au sein de la nanostructure de γ -CD-C₁₀.

En ce qui concerne les systèmes réservoirs, les suspensions sont stabilisées par la mise en œuvre du couple d'agents tensioactifs Montane[®] 80/ Montanox[®] 80. Les travaux de formulation ont permis d'obtenir des suspensions colloïdales fortement concentrées en ART (1,3 à 1,7 mg/mL) tout en réduisant les quantités de tensioactifs dans le milieu (0,15 % m/v Montanox[®] 80 et 0,15 % m/v Montane[®] 80) (cf Tableau 2 Yaméogo *et al.* 2012). La solubilité élevée de l'ART dans le benzoate de benzyle (83 mg/mL) et la valeur de log *P* de (2,8), déterminées expérimentalement (annexes 2 et 4), sont en faveur d'une bonne prise en charge du principe actif au sein de la phase interne des nanoréservoirs (95 % de rendement d'association).

Pour tous ces systèmes nanosphères et nanoréservoirs, les images MET après coloration négative et/ou de cryo-MET ont montré que l'incorporation de l'ART semble ne pas avoir d'influence sur la morphologie des particules. Les études en DRX sont en cours afin d'évaluer l'influence de la présence du principe actif sur l'ultrastructure des nanoparticules. De même, des expériences à température élevée sont prévues afin de déterminer si les transitions structurales réversibles observées à 100 et 130°C n'entraîneront pas une désorption de principe actif.

Elaboration de nanoparticules furtives

Le site d'action privilégié des nanovecteurs formulés est le sang. Par ailleurs, Gèze *et al.* (2007) ont montré que les nanosphères de β -CD-C₆ présentaient un fort tropisme hépatosplénique. Ces observations conduisent donc à rendre furtive les nanoparticules afin de prolonger leur résidence vasculaire. La furtivité est conférée par une décoration surfacique des nanoparticules par des dérivés de polyéthylène glycol (PEG). Cette décoration a un double objectif : hydrophiliser la surface des particules et créer une barrière stérique pour empêcher les opsonines de s'adsorber sur les particules. Ici, l'approche que nous avons initiée s'appuie sur le concept de co-nano-assemblage de la γ -CD-C₁₀ avec des dérivés amphiphiles commerciaux de PEG, dans les conditions de nanopréciipitation.

Les résultats obtenus avec la γ -CD-C₁₀ en présence d'esters de PEG et d'acides gras (stéarate de PEG1500 ou stéarate de PEG4000) et de conjugué phospholipide-PEG (DMPE-mPEG2000) montrent que les deux types de dérivés amphiphiles s'organisent ensemble sous la forme de suspensions colloïdales stables en milieu aqueux sur plusieurs semaines.

Les dérivés de PEG testés se distinguent par la longueur de la chaîne de PEG et la nature du groupe hydrophobe. L'ancrage de l'amphiphile PEGgylé au sein de la nanostructure est favorisé par les interactions entre les portions aliphatiques de chaque constituant. L'ajout d'électrolyte (NaCl à 0.9 %) dans le milieu ne perturbe pas la stabilité des suspensions, suggérant une orientation vers l'extérieur de la couronne de PEG qui crée une barrière hydrophile et stérique à la floculation, classiquement rencontrée dans ces conditions (Heurtault *et al.* 2003a, 2003b). Une représentation schématique des structures PEGylées est proposée à la figure 5.

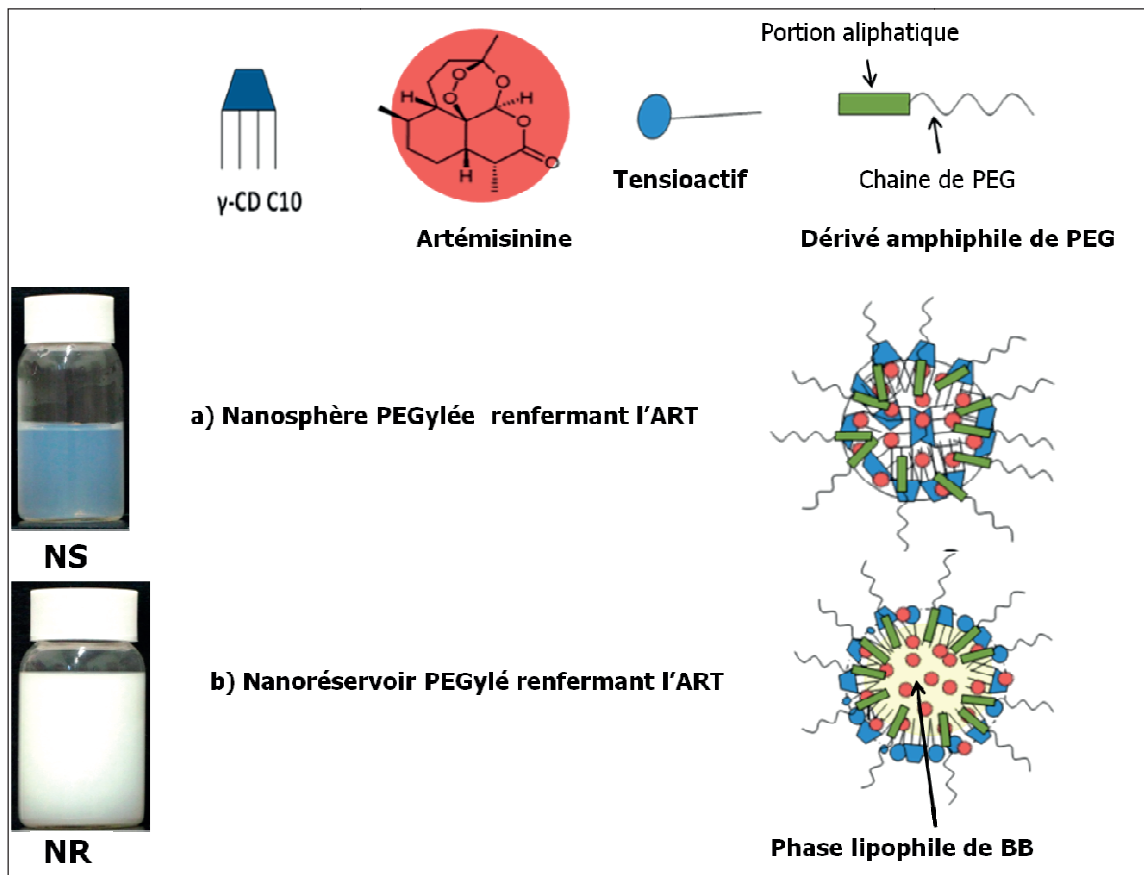


Figure 5 : Représentation schématique des nanostructures de γ -CD-C₁₀ décorées en surface par des dérivés amphiphiles de PEG (Yaméogo *et al.* 2012).

Les mesures de tailles et de potentiel zêta (augmentation de la taille des nanoparticules et réduction de la valeur de la charge de surface) suggèrent que le PEG est présent à la surface des particules. Cette couronne hydrophile, qui protège les particules de la floculation par répulsion stérique, est susceptible de leur conférer une certaine furtivité (Moghimi *et al.* 2001, Béduneau *et al.* 2006, Huynh *et al.* 2010). Outre le caractère potentiellement furtif et la stabilité physique conférée par la couronne d'amphiphiles PEGylés, on observe une amélioration sensible de l'association de l'ART aux particules (0,5

mg/mL contre 0,3 mg/mL sur les particules non décorées). Par ailleurs, la couronne PEGylée est susceptible de protéger de la désorption de l'ART associée à la surface des particules. Le ratio molaire CD/dérivé de PEG ayant conduit aux résultats les plus satisfaisants est 4/1. Dans le cas des nanoréservoirs, l'ART présente une grande affinité avec la phase interne, le benzoate de benzyle. De ce fait, le dosage de l'ART dans les nanoréservoirs indépendamment de la nature du dérivé PEGylé utilisé, est supérieur à celui des nanosphères (1,6 mg/mL contre 0,5 mg/mL). Pour la stabilisation et la furtivité des nanoréservoirs le ratio molaire CD/dérivé de PEG de 8/3.

Ces nanovecteurs obtenus par co-nano-assemblage ont également fait l'objet de caractérisations morphologiques. Les images de MET après coloration négative montrent que les systèmes nanosphères de γ -CD-C₁₀ stabilisés par les dérivés polyoxyéthylénés sont facettés alors que les particules ne contenant pas d'agent stabilisant ne le sont pas. Cette observation pourrait s'expliquer par l'organisation des chaînes de PEG qui, en fonction de leur densité, forment une couche plus ou moins rigide à la surface des particules. Dans le cas des formes nanoréservoirs, la déformation et la coalescence observées avec les formulations non PEGylées, sont moins marquées lorsque ces formulations contiennent des chaînes de PEG en surface. Ces dernières confèrent donc une certaine rigidité aux particules.

Les profils de libération de l'ART *in vitro* ont été examinés suivant une méthode appropriée adaptée aux systèmes nanoparticulaires (méthode de dilution-centrifugation) (Polato *et al.* 1994, Lemos-Sena *et al.* 1996). Les conditions de l'essai ont été fixées en fonction des concentrations à saturation de l'ART dans les milieux de libération, déterminées expérimentalement (cf. annexe 2).

Les expériences menées à 37°C dans l'eau distillée et dans le tampon phosphate sodique pH 7,4 donnent lieu à des profils de libération similaires (Figure 6). Les suspensions de nanosphères ne contenant pas d'agent stabilisant n'ont pas été évaluées dans le PBS du fait de leur instabilité dans ce milieu (floculation).

L'ART associée est libérée des nanoréservoirs en quatre jours alors qu'une période de onze jours est nécessaire dans le cas des nanosphères. Il est à noter qu'une première phase de libération massive est observée au bout d'une heure, soit 32 et 50 % de l'ART pour les nanoréservoirs et les nanosphères, respectivement. Au temps T = quatre jours, la totalité de l'ART (100 %) est libérée des nanoréservoirs. Dans la même période de temps, les nanosphères retiennent encore 20 % de leur charge initiale.

La cinétique de libération plus ralentie obtenue avec les nanosphères présage d'une extraction séquentielle plus longue de l'ART : libération rapide de l'ART surfacique, suivie de la fraction de principe actif dispersée dans la nanostructure et finalement de celle interagissant probablement plus fortement avec la cavité de la γ -CD. Cette dernière éventualité est confortée par les travaux de Wong *et al.* (2003), qui rapportent la formation de complexes entre l'ART et la γ -CD. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse de l'existence de sites de fixation spécifiques de l'ART permettant de moduler sa libération à partir de la nanostructure. Des cinétiques de libération séquentielle avaient été également obtenues avec le diazépam associé à la γ -CD-C₁₀ (Gèze *et al.* 2009). Ces hypothèses de localisation du principe actif dans la nanostructure restent à confirmer par des études supplémentaires.

En ce qui concerne la libération de l'ART à partir des structures nanoréservoirs, celle-ci semble principalement gouvernée par le coefficient de partage du principe actif entre la phase lipophile interne des particules et le milieu extérieur aqueux.

Il est intéressant de noter également que les profils de libération *in vitro* de l'ART à partir des différents types de nanovéhicules PEGylés ne sont pas impactés de manière significative par la présence de la couronne hydrophile et ce quelque soit le type de dérivé PEGylé mis en œuvre. Il semble que le faible ratio molaire de stéarate de PEG ou de DMPE-PEG2000/ γ -CD-C₁₀ ne perturbe pas la diffusion du principe actif à partir des nanostructures.

Pour une bonne prise en charge du paludisme, les formulations doivent permettre l'obtention de concentrations plasmatiques efficaces d'ART (au delà de la concentration minimale inhibitrice). Il est également important de maintenir cette concentration efficace sur une longue période, en relation au cycle parasitaire, afin d'assurer l'élimination des parasites présents de le sang. Le profil de libération multiphasique caractéristique de nanoparticules devrait permettre de répondre aux exigences thérapeutiques des crises de paludisme sévère. La libération initiale massive (burst-effet) assurerait la dose de charge et la phase de libération plus tardive maintiendrait des taux sanguins en principe actif sur une période plus ou moins importante. Cela devrait permettre en outre de réduire les fréquences et le nombre d'injections journalier et donc d'améliorer le confort des patients.

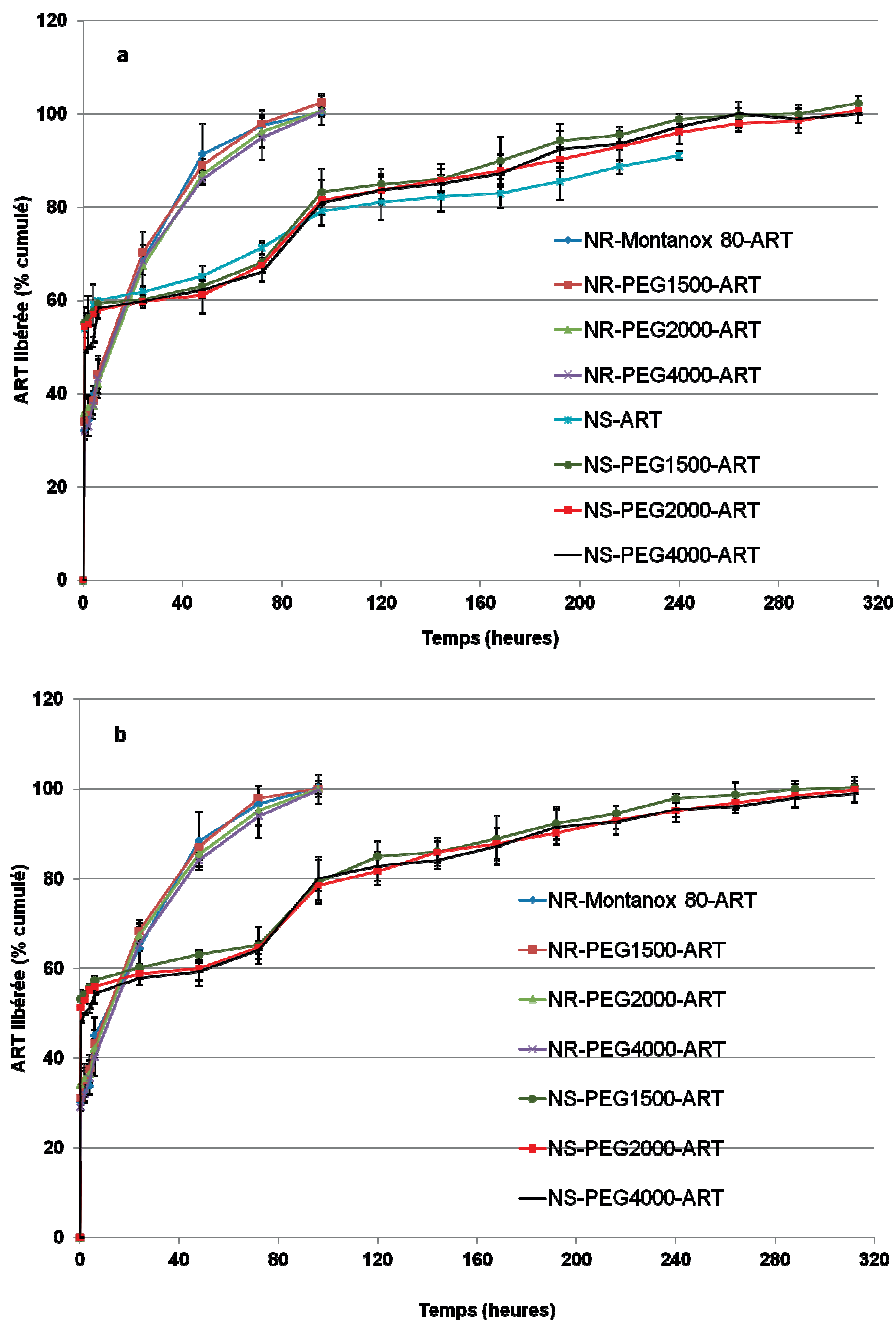


Figure 6 : Profils de libération *in vitro* à 37°C de l'ART à partir des nano-systèmes réservoirs et sphères (a) dans l'eau distillée et (b) dans le tampon phosphate sodique pH 7,4.

Sur la base des caractéristiques pharmacotechniques, nous pouvons dire que les formulations nanoparticulaires d'ART développées pourront permettre de répondre au besoin thérapeutique du paludisme. Encore faut-il démontrer le maintien de l'activité de l'ART après sa mise en forme et vérifier le caractère furtif des nanovéhicules.

2. Evaluations biologiques des systèmes nanoparticulaires

A l'issue du travail de formulation, plusieurs types de suspensions aqueuses colloïdales à base de γ -CD-C₁₀ bioestérifiées associant l'ART ont été retenus en vue de leur évaluation biologique *in vitro* et *in vivo*.

Les différents tests comparatifs mis en œuvre sont les suivants :

- essai d'activité antiplasmodiale *in vitro*,
- test *in vitro* d'hémolyse,
- test *in vitro* d'activation des protéines du complément sérique,
- test *in vitro* de capture par les cellules de macrophage,
- test *in vivo* de biodistribution des nanovecteurs,
- test *in vivo* de profil pharmacocinétique de l'ART.

Afin de mesurer le potentiel d'efficacité de l'ART associée aux nanostructures, nous avons évalué *in vitro* l'activité antiplasmodiale de trois formulations. Il s'agit des nanosphères γ -CD-C₁₀/stéarate de PEG4000, de nanoréservoirs conventionnels stabilisés avec le Montanox[®] 80 et de nanoréservoirs stabilisés en présence de stéarate de PEG4000. Des suspensions colloïdales blanches correspondantes ont été également testées. Les nanosphères formulées sans agent stabilisant ne se sont pas révélées suffisamment stables dans le milieu de culture pour être retenues dans cette étude. Quatre principes actifs antipaludiques (artémisinine, dihydroartémisinine, chlorhydrate de quinine, diphosphate de chloroquine) solubilisés dans des solvants appropriés sont utilisés comme substances de référence.

Cette étude a été menée en collaboration avec Dr Sirima Sodiomon au Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP), Ouagadougou, Burkina Faso.

L'activité antiplasmodiale est évaluée sur deux souches de laboratoire de *P. falciparum*, de sensibilité différente à la chloroquine *in vitro*, à savoir la souche K1 chloroquino-résistante et la souche 3D7 chloroquino-sensible. Le seuil de résistance d'une souche à la chloroquine est de 100 nM.

La technique du *Plasmodium* lactate déshydrogénase (*p*-LDH) est utilisée pour évaluer le taux de croissance des parasites. Cette méthode colorimétrique de détermination de la sensibilité *in vitro* du *P. falciparum* aux antipaludiques est basée sur la détection de la LDH spécifique de *P. falciparum* (*p*-LDH) (Makler *et al.* 1998). Concrètement, il s'agit de mesurer l'inhibition de la croissance des parasites en culture en présence de diverses concentrations

de molécules actives. L'activité antiplasmodiale des suspensions colloïdales ou des molécules de référence est mesurée après 72 heures d'incubation à 37°C.

Les concentrations d'ART des nanoparticules capables d'inhiber 50 % de croissance du parasite (CI_{50}) calculées avec les mesures de densités optiques sont satisfaisantes (Figure 12 de la publication de résultats n°1). En effet, toutes les formulations chargées d'ART sont actives *in vitro* sur les souches chloroquino-résistantes (K1) et les souches chloroquino-sensibles (3D7) de *P. falciparum*. Les CI_{50} de l'ordre de 3 à 6 ng/mL sont comparables à celles d'une solution d'ART (solubilisée dans le méthanol en quantité non toxique) déterminée dans les mêmes conditions, soit 3 à 5 ng/mL. Par ailleurs aucune inhibition significative de la croissance parasitaire n'a été observée lorsque les deux souches sont incubées avec des nanoparticules blanches. Cette observation confirme que l'activité mesurée est attribuée à l'ART contenue dans les particules. Les faibles valeurs de CI_{50} obtenues indiquent que l'ART associée aux nanostructures de γ -CD- C_{10} conserve son activité antiplasmodiale. Ce résultat augure de la potentialité thérapeutique des nanosystèmes après leur administration par voie parentérale.

Afin de vérifier que la couronne hydrophile créée autour des nanoparticules par les dérivés de PEG était suffisante pour induire leur furtivité, les propriétés d'activation des protéines du complément plasmatique et de capture par les macrophages des différentes suspensions colloïdales ont été mesurées et comparées. Ces tests *in vitro* sont utilisés comme éléments de prédiction du comportement des nanoparticules exposées au système des phagocytes mononucléés (SPM) (Passirani *et al.* 1998, Mosqueira *et al.* 2001, Béduneau *et al.* 2006).

Ces études ont été réalisées en collaboration avec Professeur Catherine Passirani au sein de l'unité Inserm U 646 de l'Université d'Angers.

Une évaluation de l'activité hémolytique intrinsèque des nanosystèmes a été réalisée en même temps que le test d'activation du complément par détermination de l'hémolyse provoquée par les particules elles-mêmes sans intervention des protéines du complément.

Nous observons que l'effet hémolytique (pourcentage d'hémolyse) est proportionnel à la concentration des suspensions colloïdales. Toutefois, les formulations de nanoparticules de γ -CD- C_{10} décorées ou non en surface par les dérivés de PEG utilisés, chargées ou non d'ART, ont montré une très faible toxicité vis-à-vis des érythrocytes de mouton. En effet, ces particules à la concentration de 600 cm^2/mL de surface développée, causent moins de 10 %

d'hémolyse. Les très faibles pourcentages d'hémolyse (< 2 %) sont observés avec les systèmes de type sphère. Les systèmes type réservoir présentent des profils d'hémolyse plus élevés certainement en raison de la présence de quantités de tensioactifs plus élevées dans la formulation. Cependant, les concentrations en particules utilisées dans les milieux d'épreuve sont très élevées. L'effet de dilution *in vivo* après administration intraveineuse, minimiserait considérablement cette activité hémolytique observée *in vitro*. Nous avons également observé que l'incorporation de l'ART au sein de ces nanostructures se traduit par une faible diminution des pourcentages d'hémolyse. Ces résultats augurent de la sécurité d'emploi des nanosystèmes proposés et permettent d'envisager leur administration par voie parentérale.

Afin d'étudier les interactions des protéines du complément avec les nanovecteurs de γ -CD-C₁₀, nous avons réalisé un dosage cinétique de la capacité hémolytique résiduelle (CH50) du système du complément après contact avec des concentrations croissantes de suspensions colloïdales. Les systèmes nanosphères et nanoréservoirs sans ART stabilisés ou non avec différents dérivés amphiphiles polyoxyéthylénés (polysorbate 80, stéarate de PEG1500, stéarate de PEG4000 et DMPE-mPEG2000) ont été d'abord testés. La bonne stabilité des nanosystèmes (vérifiée par des essais de dilution) dans le milieu d'incubation utilisé est préalablement établie avant la réalisation du test. Les suspensions de nanosphères non PEGylées sont quand à elles stabilisées par addition d'environ 0,01 % de polysorbate 80 dans le milieu afin d'éviter l'agrégation des particules, pouvant entraîner une augmentation d'activation du complément. Des nanoparticules de PMMA (Polyméthacrylate de méthyle), connues pour leur pouvoir d'activation du complément, sont utilisées comme témoin positif. La préparation et la conservation des lots de particules sont faites dans des conditions de propreté microbiologique suffisante afin d'éviter une activation du complément par d'éventuels contaminants. Le principe de ce test est décrit dans la publication de résultats n°2.

Les réponses obtenues sont exprimées en pourcentage de consommation d'unités CH50 en fonction de la surface croissante des nanoparticules, calculée à partir de leur concentration et de leur masse volumique. Afin d'accéder à cette dernière et donc à la surface spécifique des particules, nous avons développé une méthode de mesure de masse volumique de particules par ultracentrifugation en gradient de densité de Percoll®.

Comme attendu, nous observons que la consommation des protéines du complément sérique par les nanoparticules est proportionnelle à la surface spécifique particules. En effet,

pour une formulation donnée, l'adsorption des protéines du complément est plus importante lorsque la surface totale développée par les particules est élevée.

Des différences significatives de profils d'activation du complément par les nanovecteurs de γ -CD-C₁₀ en fonction d'une part de la taille des particules et d'autre part de la nature du dérivé de PEG utilisé comme agent de décoration de surface ont été mises en évidence. Cependant, nous ne constatons pas d'effet significatif de l'association de l'ART aux nanovecteurs sur leurs profils d'activation du complément.

Le moyen le plus efficace pour comparer les différentes formulations est l'utilisation des taux d'activation des protéines du complément obtenues avec des concentrations en nanoparticules correspondantes à celles utilisées lors d'une injection intraveineuse chez l'animal (200 μ L de suspension colloïdale, soit une surface spécifique de particules de 200 cm^2/mL).

De manière générale, l'activation des protéines du complément augmente avec la taille des nanoparticules, les systèmes nanoréservoirs (tailles d'environ 180 nm) étant plus activateurs que les systèmes nanosphères (tailles comprises entre 65 à 85 nm). Plusieurs auteurs ont déjà rapporté l'influence de la taille des nanoparticules sur l'activation du système du complément (Harashima *et al.* 1994, Vonarbourg *et al.* 2006). Une étude réalisée par Vonarbourg *et al.* (2006) avec des nanocapsules lipidiques dont les tailles variaient entre 20 et 100 nm a montré une plus forte activation des protéines du complément par les particules de tailles plus élevées.

La nature du dérivé de PEG utilisé, notamment la masse moléculaire des chaînes de PEG semble jouer un rôle important sur les propriétés d'activation des protéines du complément par les nanoparticules. En effet, des taux élevés d'activation du complément sont obtenus avec les nanosphères et les nanoréservoirs γ -CD-C₁₀/stéarate de PEG4000 à 200 cm^2/mL (50 et 75 %, respectivement). Cependant, la présence de dérivés de PEG de chaînes moyennes (1500 et 2000) induit une diminution significative de l'adsorption des protéines sériques à la surface des particules, notamment dans le cas des nanosphères (25 % d'activation à 200 cm^2/mL). L'organisation des chaînes de PEG autour des particules pourrait expliquer cette différence. Il semble que l'arrangement des chaînes de PEG de masse moléculaire 1500 et 2000 Da à la surface des nanosphères permet d'assurer une protection des particules contre l'adsorption des opsonines. Cette protection est sensée ralentir ou réduire leur élimination du courant sanguin par les organes du système réticulo-endothélial.

Nous constatons avec surprise que le conjugué dimyristoylphosphatidyléthanolamine-polyéthylène glycol 2000 (DMPE-mPEG2000) qui a un effet protecteur sur les nanosphères, induit une très forte activation des protéines du complément lorsqu'il est utilisé dans les formulations de nanoréservoirs (75 % d'activation à 200 cm²/mL). Outre le paramètre taille, ce résultat pourrait être dû au fait que le dérivé polyoxyéthyléné ne s'intègre pas bien au sein de la structure des nanoréservoirs. Par conséquent l'arrangement des chaînes de PEG autour des particules n'est pas suffisant pour empêcher l'adsorption des protéines. Il se peut que la portion aliphatique (phospholipides) de ce dérivé soit exposée à l'extérieur des réservoirs et est donc accessible aux protéines plasmatiques. Ce qui a pour conséquence d'induire une forte consommation des protéines du complément plasmatique. Des taux d'activation relativement plus bas sont obtenus à 200 cm²/mL avec les formulations nanoréservoirs stabilisées avec le stéarate de PEG 1500 et le polysorbate 80 (35 et 40 %, respectivement).

Les résultats du test de phagocytose par les cellules macrophagiques s'inscrivent dans la même logique que ceux du test d'activation du complément. Les particules (nanosphères et nanoréservoirs) décorées par le stéarate de PEG4000 montrent là encore un profil défavorable avec une forte adsorption extracellulaire et une forte phagocytose par les cellules du macrophage. Celles contenant le stéarate de PEG 1500 ou le DMPE-mPEG2000 sont moins phagocytées.

Un résultat intéressant observé est la capacité des nanoréservoirs recouverts de Montanox[®] 80 à échapper *in vitro* à la capture par les macrophages. En effet, le Montanox[®] 80 ou polysorbate 80 est un mono-ester d'acide gras (monooléate de sorbitane) et de polyoxyéthylène (Figure 7). Les chaînes polyoxyéthylène seraient impliquées dans cet effet protecteur vis-à-vis du SPM. Un résultat similaire a déjà été rapporté par Gelperina *et al.* (2002) avec les nanoparticules de poly(butylcyanoacrylate) recouvertes de polysorbate 80.

A l'issue des évaluations *in vitro* et après conjonction de l'ensemble des données obtenues, quatre formulations se dégagent comme prometteuses sur le plan de la furtivité. Il s'agit des nanoréservoirs contenant le polysorbate 80 ou le stéarate de PEG1500 et des nanosphères stabilisées avec le stéarate de PEG1500 ou le DMPE-mPEG2000.

Afin de consolider les résultats obtenus *in vitro*, des évaluations chez l'animal ont été réalisées avec les nanovecteurs de γ -CD-C₁₀ décorés ou non en surface. Outre la vérification de la furtivité des particules, les études *in vivo* devront également permettre d'évaluer la tolérance des nanovecteurs par l'animal.

Les distributions sanguine et tissulaire des nanoparticules ont été évaluées de manière semi-quantitative sur différentes cohortes de souris nude par la mise en œuvre de l'imagerie de fluorescence. Cette technique s'est avérée être un outil précieux permettant d'accéder au profil de biodistribution et au comportement *in vivo* des nanoparticules selon la nature de leur décoration surfacique (Faure *et al.* 2009, Sancey *et al.* 2009, Dufort *et al.* 2010).

Cette étude est réalisée en collaboration avec Dr. Jean Luc Coll (Equipe 5 : Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer, Institut Albert Bonniot de Grenoble).

L'association d'un traceur fluorescent aux nanosystèmes a été nécessaire pour permettre de suivre leur devenir *in vivo*. Dans cette technique, il est préférable d'utiliser des fluorophores dont les rayonnements d'excitation et d'émission de fluorescence se situent dans la fenêtre du proche infra-rouge, de manière à palier les limitations liées aux propriétés optiques des tissus (Dufort *et al.* 2010). Des fluorophores tels que les dérivés lipophiles de cyanine (1,1'-dioctodécyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate ou DiD, $\lambda_{ex} = 643$ nm; $\lambda_{em} = 669$ nm) répondent à ces exigences et sont adaptés à l'imagerie du petit animal entier (Morille *et al.* 2010).

La technique consiste à suivre le traceur fluorescent associé aux nanoparticules en observant leur émission de fluorescence après les avoir excités par une source lumineuse (Faure *et al.* 2009, Sancey *et al.* 2009, Dufort *et al.* 2010).

Un screening *in vivo* des nanosphères et nanoréservoirs différemment fonctionnalisées en surface a été réalisé, en suivant leur distribution et leur mode d'élimination suite à une administration intraveineuse de 200 μ L de suspensions colloïdales fluorescentes.

Les nanoparticules recouvertes par certains dérivés de PEG, en particulier les stéarates de PEG 1500 et 4000, sont rapidement éliminées de la circulation sanguine dans les cinq premières minutes qui suivent l'injection intraveineuse. Elles sont vite captées par le foie et la rate suite à l'adsorption des protéines plasmatiques et /ou leur phagocytose par les macrophages. Par contre, les nanoréservoirs γ -CD-C₁₀/polysorbate 80 et les nanosphères γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000, sont détectables dans le réseau sanguin près d'une heure après l'injection. De plus, après 24 heures, le signal de fluorescence est retrouvé dans le plasma des animaux ayant reçu la suspension de nanosphères γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000. Ainsi, ces deux formulations séjournent plus longtemps dans le sang, ce qui retarde de manière significative leur captation ultérieure par les organes du système des phagocytes mononuclées (foie et rate, principalement). Comme évoqué dans les paragraphes précédents, la masse moléculaire des chaînes de PEG utilisées semble jouer un rôle important dans l'arrangement de ces molécules à la surface des nanoparticules. Ceci

pourrait expliquer les différences de biodistribution observées avec les nanoparticules différemment fonctionnalisées.

Le niveau significatif de signal de fluorescence détecté au niveau de l'estomac suggère une élimination hépatobiliaire des nanoparticules. Egalement, le faible niveau de fluorescence détectable dans les poumons confirme la stabilité des suspensions colloïdales dans les fluides biologiques.

Ces résultats montrent l'influence de la fonctionnalisation de surface sur la distribution des nanoparticules et une corrélation peut être établie entre les résultats *in vitro* et *in vivo*. La modification de la surface des nanoparticules par des molécules hydrophiles, notamment le polysorbate 80 et le DMPE-mPEG2000 (figure 7) permet de réduire l'opsonisation et /ou la reconnaissance par les macrophages, et donc de contrôler leur distribution et d'étendre leur temps de circulation dans le sang. Le fort encombrement stérique induit par l'organisation de ces molécules hydrophiles autour des particules pourrait expliquer les différences de biodistribution observées entre les particules différemment fonctionnalisées (Passirani *et al.* 1998).

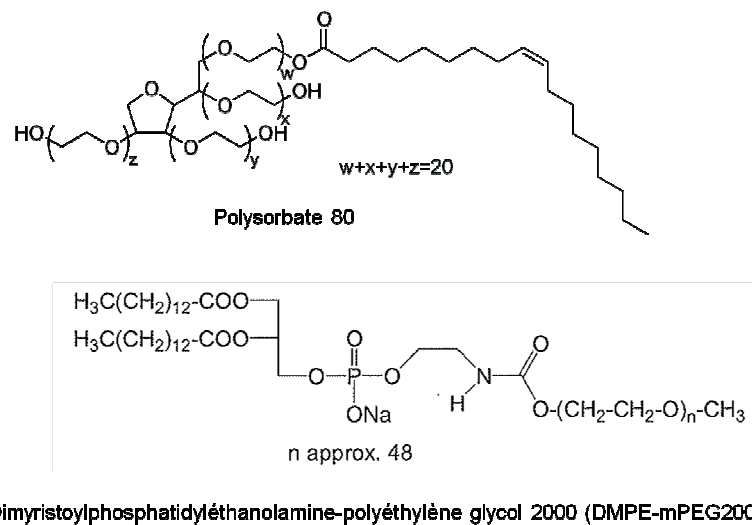


Figure 7 : Structures chimiques du polysorbate 80 et du DMPE-mPEG2000.

La disparition plus rapide du réseau vasculaire, des nanoréservoirs contenant le polysorbate 80 comparée aux nanosphères recouvertes de DMPE-mPEG2000 peut encore une fois s'expliquer par la différence de taille qui caractérise les deux systèmes. Ce résultat est en accord avec les données des tests *in vitro* qui montrent une plus faible adsorption des protéines du complément sur les systèmes nanosphères (environ 80 nm de diamètre) par rapport aux systèmes nanoréservoirs (environ 180 nm).

Les résultats de ces études *in vitro* et *in vivo* constituent incontestablement une avancée importante dans l'amélioration de la rémanence vasculaire des nanoparticules de CD amphiphiles eut égard à ce qu'avait rapporté Gèze *et al.* (2007) sur les nanoparticules de CD non modifiées en surface. Les données récoltées permettent de positionner les nanosystèmes fonctionnalisés par co-nano-assemblages de dérivés amphiphiles de CD et de PEG comme vecteurs d'agents bioactifs. Cette approche qui permet de conférer une furtivité aux nanoparticules par la formulation a l'avantage d'éviter les processus de fonctionnalisation par voie chimique, très lourds et parfois difficiles à mettre en œuvre. L'ensemble des résultats de ces études est présenté sous forme d'un projet de publication qui sera soumis à European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (EJPB).

Une évaluation de la cinétique de distribution plasmatique des nanoréservoirs et des nanosphères stabilisées respectivement par le polysorbate 80 ou le DMPE-mPEG2000 est en cours. Cette étude permettra de quantifier en fonction du temps, les nanoparticules circulant dans le compartiment plasmatique par rapport à la concentration injectée à l'animal.

Pour obtenir les informations sur le devenir *in vivo* de l'Artémisinine associée aux nanoparticules, une étude de pharmacocinétique sur des rats Wistar mâles âgés d'au moins 8 semaines (masse corporelle moyenne de 300 g) est en cours de réalisation. Cependant, les résultats déjà obtenus permettent de tirer les premières conclusions.

Cette étude est réalisée en collaboration avec le Docteur Diane Godin-Ribuot (laboratoire d'Hypoxie Physiopathologie HP2/U1042 Inserm, UFR de Pharmacie, Université de Grenoble 1).

Cette évaluation concerne les nanoréservoirs et les nanosphères stabilisées respectivement avec le polysorbate 80 et le DMPE-mPEG2000. Ces deux systèmes ont été sélectionnés sur la base des résultats précédents. La méthodologie utilisée est détaillée en annexe 8. Une formulation témoin (solution hydro-éthanolique d'ART) est utilisée.

Les formulations sont administrées par la veine caudale (administration unique rapide pendant 1 minute) à la dose de 2 ou 1,5 mg d'ART/kg de masse corporelle, selon la formulation. Les prélèvements sanguins sont réalisés au moyen d'un cathéter mis en place dans l'artère carotide aux temps 5, 15 minutes puis 1, 2, 6, 8 et 24 heures après l'injection. L'ART est quantifiée dans le plasma par dosage CLHP-DEDL (méthode décrite en annexe 1) après extraction préalable suivant une procédure décrite par Ashton *et al.* (1998).

Les profils des concentrations plasmatiques d'ART en fonction du temps sont présentés aux figures 8 et 9.

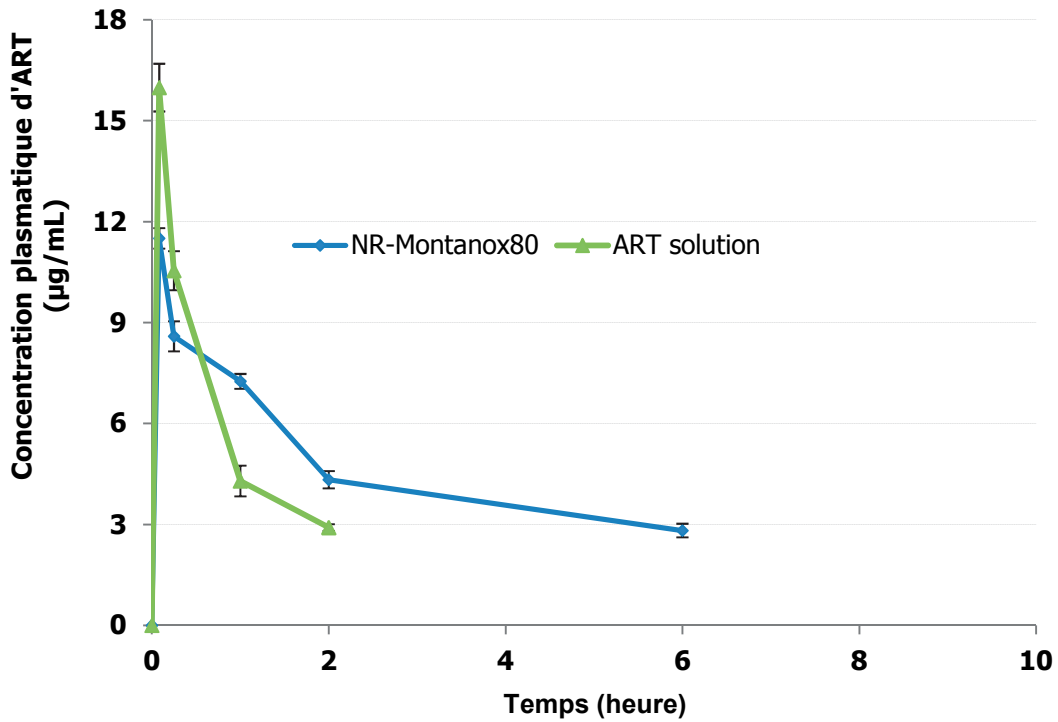


Figure 8 : Profils des concentrations plasmatiques moyennes de l'ART (moyenne \pm EC) après administration intraveineuse des formulations nanoréservoir de γ -CD-C₁₀/Montanox[®] 80 et solution hydro-éthanolique d'ART à la dose de 2 mg/kg de poids corporel de rat wistar mâle.

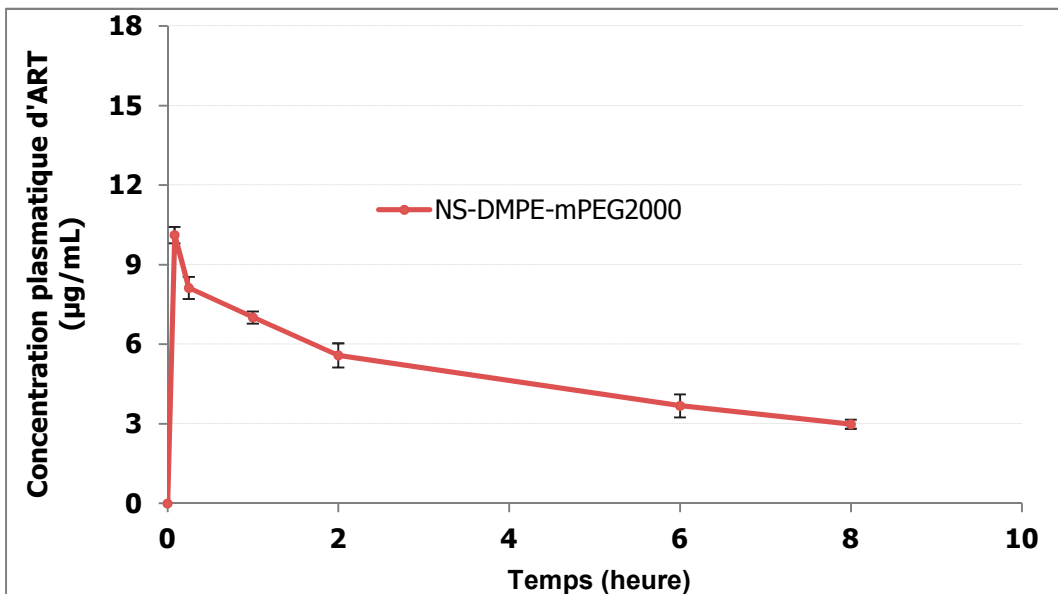


Figure 9 : Profil des concentrations plasmatiques moyennes de l'ART (moyenne \pm EC) après administration intraveineuse de la formulation nanosphère γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000 à la dose de 1,5 mg/kg de poids corporel de rat wistar mâle.

Les paramètres pharmacocinétiques de l'ART sont déterminés pour chaque essai par utilisation d'un modèle à deux compartiments décrivant l'évolution des profils de concentrations d'ART. Ce modèle est construit grâce à un Macro-Excell par régression non linéaire à partir des données de concentrations d'ART dans le plasma.

L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps (AUC_{0-t}) est calculée par la méthode des trapèzes et correspond à l'aire sous la courbe du temps t_0 au temps du dernier point quantifiable (2, 6 et 8 heures pour la solution d'artémisinine, la formulation NR-Montanox[®] 80 et la formulation NS-DMPE-mPEG2000, respectivement). L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques du temps t_0 au temps infini (AUC_{0-inf}) est obtenue par extrapolation sur les limites inférieures. Delta AUC représente la valeur de l'extrapolation. Le pourcentage du delta AUC par rapport à l' AUC_{0-t} est également déterminé. Les valeurs de C_{max} sont celles directement observées sur la courbe des profils de concentrations plasmatiques.

La constante d'élimination (k) et la demi-vie d'élimination plasmatique ($t_{1/2} = \ln(2)/k$) sont calculées par régression semi-logarithmique des valeurs de concentrations plasmatiques sur les valeurs de temps, du temps t_0 au temps du dernier point quantifiable. La clairance totale est calculée en divisant la dose administrée par l' AUC_{0-inf} du temps $t = 0$ jusqu'à l'infini. Le volume de distribution à l'équilibre (V_d) est déterminé à partir de la relation CL/k .

Tableau III : Paramètres pharmacocinétiques de l'artémisinine après administration intraveineuse des nanoréservoirs de γ -CD- C_{10} /Montanox 80 (2 mg/kg), des nanosphères γ -CD- C_{10} /DMPE-mPEG2000 (1,5 mg/kg) et de la solution hydro-éthanolique (10%) d'artémisinine (2 mg/kg).

Paramètres pharmacocinétiques	Solution d'artémisinine (éthanol à 10 %) (2 mg/kg)	Nanoréservoirs γ -CD- C_{10} / Montanox [®] 80 (2 mg/kg)	Nanosphères γ -CD- C_{10} /DMPE-PEG2000 (1,5 mg/kg)
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	12,04 \pm 0,49	28,19 \pm 1,00	39,14 \pm 2,31
AUC_{0-inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	15,43 \pm 0,52	41,34 \pm 2,31	60,83 \pm 3,11
delta AUC	3,39 \pm 0,14	13,15 \pm 1,53	21,70 \pm 1,93
% de delta AUC	28,18 \pm 1,49	46,66 \pm 4,48	55,44 \pm 5,67
$t_{1/2}$ (h)	0,81 \pm 0,01	3,23 \pm 0,16	5,03 \pm 0,24
k	0,89 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	15,92 \pm 0,71	11,50 \pm 0,31	10,12 \pm 0,31
CL (mL/h)	34,88 \pm 1,33	13,79 \pm 0,77	7,40 \pm 0,37
V_d (mL)	39,16 \pm 1,57	64,31 \pm 1,65	53,68 \pm 1,26

Ces résultats montrent une différence significative des paramètres pharmacocinétiques après administration des trois types de formulations d'ART. Après administration intraveineuse, la concentration plasmatique d'ART détectée après 5 minutes est plus élevée

avec le groupe témoin recevant la solution hydro-éthanolique d'artémisinine qu'avec les deux autres groupes recevant les formulations nanoparticulaires. Les concentrations plasmatiques maximales (C_{max}) détectées après 5 minutes sont un peu plus faibles avec les formulations nanoparticulaires et correspondent à environ 30 % et 45 % de la dose injectée, respectivement pour les nanoréservoirs et les nanosphères. Ces concentrations sont en accord avec les données de libérations initiales observées *in vitro*.

Les profils des concentrations plasmatiques en fonction du temps sont biphasiques avec une phase de distribution rapide et une phase d'élimination lente.

L'ART est très vite éliminée de la circulation sanguine après injection de la solution hydro-éthanolique. La concentration plasmatique atteint la limite quantifiable en seulement deux heures et le temps de demi-vie de l'ART dans ce groupe témoin est de $0,81 \pm 0,01$. La concentration plasmatique de l'ART diminue un peu plus lentement avec les nanoréservoirs jusqu'à un niveau correspondant à la limite de quantification de la méthode CLHP utilisée ($2,8 \mu\text{g/mL}$) à environ 6 heures. Cependant, après l'administration des nanosphères PEGylées, l'ART est détectée dans le plasma ($3 \mu\text{g/mL}$ d'ART) jusqu'au temps 8 heures. Les concentrations moyennes détectées aux derniers points correspondent à environ 10 % et 13 % de la dose administrée, respectivement.

Les temps de demi-vie plasmatique de l'ART contenue dans les nanoréservoirs ($3,23 \pm 0,16$ h) et dans les nanosphères ($5,03 \pm 0,24$ h) sont significativement plus élevés d'environ 4 et 6 fois, respectivement. Ces résultats peuvent être attribués aux propriétés de libération différentes de l'ART à partir des formulations. Il semble que l'extraction séquentielle et prolongée de l'ART à partir des nanoparticules conduise à un temps de circulation plasmatique plus long. Les nanovecteurs de cyclodextrines protègent l'ART de l'élimination rapide.

Le temps de demi-vie plasmatique de l'ART à partir des nanosphères γ -CD- C_{10} /DMPE-mPEG2000 est plus élevé d'environ une heure et demie que celui des nanoréservoirs γ -CD- C_{10} /Montanox[®] 80, malgré le C_{max} plus grand obtenu avec les nanoréservoirs. Egalement, la constante d'élimination de l'ART est significativement plus réduite avec les nanosphères. Ces résultats montrent que l'ART est plus vite éliminée lorsqu'elle est injectée sous forme solution que sous la forme de suspension de nanoréservoirs ou de nanosphères.

La clairance plasmatique de l'ART est élevée avec les nanoréservoirs ($13,79 \pm 0,77$ L/h) par rapport aux nanosphères ($7,40 \pm 0,37$ L/h), suggérant une extraction hépatique plus élevée des nanoréservoirs. Ce résultat est en accord avec les données de biodistribution qui

montrent une meilleure rémanence vasculaire avec les nanosphères γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000.

Les valeurs de clairance plasmatique de l'ART avec les nanoréservoirs γ -CD-C₁₀/Montanox[®] 80 (13,79 L/h) sont similaires à celles rapportées par Ashton *et al.* (1999) (12 ± 1 L/h) après administration intraveineuse unique d'une émulsion aqueuse d'ART à des rats mâles à la dose de 20 mg/kg. Cependant, avec la formulation émulsion, l'ART est très vite éliminé du torrent circulatoire ($t_{1/2} = 0,5$ h) et son volume de distribution est plus élevé (99,5 L). Isacchi *et al.* (2011) ont observé des $t_{1/2}$ de 0,38, 0,67 et 2,02 après administration intra-péritonéale de l'ART (10 mg/kg) solubilisée dans le DMSO (10 % v/v) ou encapsulée dans des liposomes conventionnelles ou PEGylées, respectivement. Les $t_{1/2}$ obtenus avec les liposomes sont plus élevés que ceux des émulsions aqueuses, mais restent inférieures aux valeurs que nous avons obtenues avec les deux formulations de nanoparticules à base de CD amphiphiles.

A titre d'exemple, les temps de demi-vie de l'ART après administration orale (sous forme de comprimés, de gélules ou tisanes) chez l'homme sont de l'ordre de 0,9 à 2,8 h selon la dose prise (250 à 500mg) (Ashton *et al.* 1998, Gordi *et al.* 2002, Rath *et al.* 2004).

Enfin, les valeurs de concentrations plasmatiques que nous avons obtenues de l'ordre de 10 à 3 μ g/mL sont largement supérieures aux CI_{50} déterminées *in vitro* sur les deux souches plasmodiales (3 à 6 ng/mL). Il est donc possible d'obtenir des concentrations plasmatiques d'ART efficaces sur environ 8 heures ou plus avec les nanoparticules de CD décorées en surface.

Les résultats obtenus montrent que les paramètres pharmacocinétiques *in vivo* de l'ART peuvent être améliorés après administration intraveineuse de nanoparticules de CD amphiphiles décorées en surface par rapport à la solution d'ART.

Il est important de noter également que les profils pharmacocinétiques de l'ART sont meilleurs avec les formulations nanosphères γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000 par rapport aux formulations nanoréservoirs γ -CD-C₁₀/Montanox[®] 80. Ces résultats peuvent être attribués d'une part à la libération plus lente de l'ART à partir des nanostructures matricielles et d'autre part à résidence vasculaire prolongée des nanosphères γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000 observée avec l'essai de biodistribution. La quantification des nanoparticules circulant dans le compartiment plasmatique en fonction du temps par rapport à la concentration injectée à l'animal est en cours. Elle permettra d'établir une bonne corrélation et d'étayer les données de pharmacocinétique.

Références

- Ashton M., Gordi T., Hai T.N., Van Huong N., Sy N.D., Nieu N.T., Huong D.X., Johansson M., Công, D., Artemisinin pharmacokinetics in healthy adults after 250, 500 and 1000 mg single oral doses, *Biopharm. Drug Dispos.* 19 (1998) 245-250.
- Ashton M., Johansson M., Thorngvist A.S., Svensson U.S., Quantitative in vivo et ex vivo sex difference in artemisinin metabolism in rats, *Xenobiotica* 29(2) (1999) 195-204.
- Béduneau A., Saulnier P., Anton N., Hindré F., Passirani C., Rajerison H., Noiret N., Benoit J.P., Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties, *Pharm. Res.* 23(9) (2006) 2190-2198.
- Choisnard L., Gèze A., Putaux J.L., Wong Y.S., Wouessidjewe D., Nanoparticles of β -cyclodextrin esters obtained by self-assembling of biotransesterified Cyclodextrins, *Biomacromol.* 7 (2006) 515-520.
- Choisnard L., Gèze A., Yaméogo B.G.J., Putaux J.L., Wouessidjewe D., Miscellaneous nanoaggregates made of β -Cyclodextrins esters synthesised by an enzymatic pathway, *Int. J. Pharm.* 344 (2007) 26-32.
- Choisnard L., Gèze A., Vanharverbeke C., Yaméogo J.B.G., Putaux J-L, Brasme B., Julien L., Boulanger S., Elfakir C., Wouessidjewe D., Physicochemical characterization of α -, β - and γ -cyclodextrins bioesterified with decanoate chains used as building blocks of colloidal nanoparticles, *Biomacromol.* 12(8) (2011) 3031-3038.
- Dufort S., Sancey L., Wenk C., Josserand V., Coll J.L., Optical small animal imaging in the drug discovery process. *Biochim. Biophys. Acta* 1798(12) (2010) 2266-2273.
- Faure A.C., Dufort S., Josserand V., Perriat P., Coll J.L., Roux S., Tillement O., Control of the *in vivo* biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings, *Small* 5 (2009) 2565-2575.
- Fessi H., Devissaguet J.P. & Puisieux F. (1986). Procédé de préparation de systèmes Colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules, French Patent FR 86184444.
- Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Ammoury N., Benita S., Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55 (1989) R1-R4.
- Gelperina S.E., Khalansky A.S., Skidan I.N., Smirnova Z.S., Bobruskin A.I., Severin S.E. *et al.*, Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma, *Toxicol. Lett.* 126(2) (2002) 131-141.
- Gèze A., Tieu Chau L., Choisnard L., Mathieu J.P., Marti-Battle D., Riou L., Putaux J-L., Wouessidjewe D., Biodistribution of intravenously administrated amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres, *Int. J. Pharm.* 344 (1-2) (2007) 135-142.
- Gèze A., Choisnard L., Putaux J-L., Wouessidjewe D., Colloidal systems made of biotransesterified cyclodextrins grafted with C10 alkyl chains, *Mater. Science Eng. C* 29 (2009) 458-462.
- Gordi T., Huong D.X., Hai T.N., Nieu N.T., Ashton M., Artemisinin pharmacokinetics and efficacy in uncomplicated-malaria patients treated with two different dosage regimens, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46(4) (2002) 1026-1031.
- Harashima H., Sakata K., Funato K., Kiwada H., Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes, *Pharm. Res.* 11 (1994) 402-406.
- Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J.E., Benoit J.P., A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharm. Res.* 19(6) (2002) 875-880.
- Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Benoit J.P., Proust J.E., Interfacial stability of lipid nanocapsules, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 30 (2003a) 225-235.
- Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J.E., Benoit J.P., Physicochemical stability of lipid nanocapsules, *Biomaterials* 24 (2003b) 4283-4300.
- Huynh N.T., Roger E., Lautram N., Benoit J.P., Passirani C., The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: passive versus active targeting, *Nanomedicine* 5 (9) (2010) 1415-1433.
- Isacchi B., Arrigucci S., la Marca G., Bergonzi M.C., Vannucchi M.G., Novelli A., Bilia A.R., Conventional and long-circulating liposomes of artemisinin: preparation, characterization, and pharmacokinetic profile in mice., *J. Liposome Res.* 21(3) (2011) 237-244.

- Lemos-Senna E., Wouessidjewe D., Duchêne D., Release profiles of a hydrophobic drug incorporated in modified cyclodextrin nanospheres, Proceedings of 8th international Symposium on Cyclodextrins, (1996) 431-434.
- Makler M.T., Ries J.M., Williams J.A., Brancroft J.E., Piper R.C., Gibbins B.L., Hinrichs D.J., Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plamosdium falciparum* drug sensitivity, Am. J. Trop. Med. Hyg. 48 (1993) 739-741.
- Memisoglu E., Bochot A., Sen M., Charon D., Duchêne D., Hincal A.A., Amphiphilic β -Cyclodextrins modified on primary face: Synthesis, characterization and evaluation of their potential as novel excipients in the preparation of nanocapsules, J. Pharm. Sci. 2002, 91(5): 1214-1224.
- Memisoglu-Bilensoy E., Dogan A.L., Hincal A.A., Cytotoxic evaluation of injectable cyclodextrin nanoparticles, J. Pharm. Pharmacol. 2006, 58: 585-589.
- Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C., Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory and practice, Pharmacol. Rev. 53 (2001) 283-318.
- Morille M., Montier T., Legras P., Carmoy N., Brodin P., Pitard B., Benoit J.P., Passirani C., Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting, Biomaterials 31(2) (2010) 321-329.
- Mosqueira V.C., Legrand P., Gulik A., Bourdon O., Gref R., Labarre D. *et al.*, Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules, Biomaterials 22 (2001) 2967-2979.
- Passirani C., Barrat G., Devissaguet J.P., Labarre D., Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system, life sciences, 62(8) (1998) 775-785.
- Polato L., Benedetti L.M., Callegaro L., Couvreur P., *In vitro* evaluation of nanoparticle formulations containing gangliosides, J. Drug Target. 2 (1994) 53-59.
- Rath K., Taxis K., Walz G., Gleiter C.H., Li S.M., Heide L., Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual wormwood), Am. J. Trop. Med. Hyg. 70(2) (2004) 128-132.
- Sancey L., Dufort S., Joserand V., Keramidas M., Righini C., Rome C., Faure A.C., Foillard S., Roux S., Boturyn D., Tillement O., Koenig A., Boutet J., Rizo P., Dumy P., Coll J.L., Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging, Int. J. Pharm. 379 (2009) 309-316.
- Skiba M., Wouessidjewe D., Fessi H., Devissaguet J.P., Duchêne D., Puisieux F., Préparation et applications de nouveaux systèmes colloïdaux nanovésiculaires dispersibles à base de cyclodextrines, sous forme de nanocapsules, French Patent 92 07285, 1992.
- Vauthier C., Bouchemal K., Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm. Res.* 26(5) (2009) 1025-1058.
- Vonarbourg A., Passirani C., Saulnier P., Simard P., Leroux J., Benoit J.P., Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake, J. Biomed. Mater. Res. A 78(3) (2006) 620-628.
- Wehrle P., Magenheimer B., The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41(1) (1995) 19-26.
- Weisse S., Kalimoutou K., Lahiani-Skiba M., Djedaini-Pilard F., Perly B., Skiba M., Investigations of topically applied vitamin A loaded amphiphilic cyclodextrin nanocapsules, J. Nanosc. Nanotech. 9(1) (2009) 640-645.
- Wong J.W., Yuen K.H., Inclusion complexation of artemisinin with α -, β - and γ -cyclodextrins, Drug Dev. Ind. Pharm. 29 (2003) 1035-1044.
- Zhao S.S., High-performance liquid chromatographic determination of artemisinin (qinghaosu) in human plasma and saliva, Analyst 112 (1987) 661-664.

L'objectif de ce travail était de développer une forme intraveineuse d'ART pour la prise en charge des crises de paludisme sévère. Pour répondre à cet objectif, nous avons mis en œuvre un certain nombre d'études complémentaires et synergiques.

A partir des dérivés bioestérifiées d' α -, β - et γ -CD-C₁₀, un important travail expérimental de formulation a été réalisé afin de mettre au point des suspensions colloïdales stables de CD amphiphiles suffisamment chargées en ART pour répondre aux exigences thérapeutiques. De surcroît, ces nanoparticules devraient être dotées de propriétés furtives de manière à obtenir des taux plasmatiques d'ART sur des temps prolongés afin d'assurer l'élimination des parasites circulants dans le sang. Pour ce faire, nous avons envisagé avec succès la possibilité d'obtenir des nanoparticules de γ -CD-C₁₀ décorées en surface par co-nano-assemblage de la γ -CD-C₁₀ avec des dérivés amphiphiles polyoxyéthylénés, dans les conditions de nanopréciipitation.

L'ajustement et l'optimisation des conditions de formulation permettent aujourd'hui de proposer des suspensions colloïdales d'ART dosées à 0,5 mg/mL (augmentation de la dose d'ART mise en solution en milieu aqueux d'un facteur 8) pour le cas des nanosphères et de 1,6 mg/mL (facteur 25) pour les nanoréservoirs. Ces systèmes colloïdaux sont capables de libérer *in vitro* l'ART sur des périodes allant de 4 jours (nanoréservoirs) à 11 jours (nanosphères).

D'autre part, il est démontré que l'activité antipaludique de l'ART *in vitro* est maintenue lorsqu'elle est utilisée sous forme de suspensions colloïdales. Le caractère non hémolytique des nanovecteurs a été démontré *in vitro* sur des suspensions de globules rouges de mouton.

Nous avons également mis en évidence une diminution significative *in vitro* de l'adsorption des protéines du complément sérique à la surface des particules de γ -CD-C₁₀ stabilisées par le polysorbate 80 ou décorées par les dérivés de PEG de chaînes moyennes (1500 et 2000 Da) comparativement aux particules décorées par les PEG de chaînes plus longues ou aux particules non-décorées. Les nanoparticules décorées par les PEG de chaînes moyennes sont également moins phagocytées *in vitro* par les cellules de macrophage.

Les données de biodistribution obtenues en imagerie de fluorescence chez la souris sont en accord avec celles obtenues *in vitro*. Les meilleurs profils de rémanence vasculaire sont obtenus avec les formulations de nanosphères γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000 et de nanoréservoirs γ -CD-C₁₀/polysorbate 80.

Enfin, l'étude de pharmacocinétique montre des profils plasmatiques favorables avec les formulations de nanosphères γ -CD-C₁₀/DMPE-mPEG2000 et de nanoréservoirs γ -CD-C₁₀/polysorbate 80 après administration intraveineuse. En effet, ces deux systèmes nanoparticulaires permettent d'améliorer les paramètres pharmacocinétiques de l'ART tels que l'allongement du temps de demi-vie, la diminution de la clairance plasmatique et la diminution du volume de distribution.

Ce travail de thèse a certainement contribué au développement de formes injectables d'ART en mettant en évidence le potentiel des nanoparticules de CD bioestérifiées comme nouvel outil d'administration de cet antipaludique. Pour compléter les travaux réalisés, des études complémentaires plus approfondies doivent être menées afin d'aboutir à l'élaboration d'une forme médicamenteuse garantissant innocuité et efficacité thérapeutique, pour ensuite envisager des essais cliniques.

Pour cela, l'efficacité *in vivo* des formulations doit être évaluée sur un modèle animal infecté par le *Plasmodium*. Une étude comparative pourra être réalisée à cet effet avec des formulations commerciales d'antipaludiques disponibles sous forme injectable à savoir l'artéméter en intramusculaire et la quinine en intraveineuse.

Dans le contexte d'optimisation de l'effet thérapeutique de l'ART, il serait également judicieux d'envisager l'adressage des érythrocytes avec les nanoparticules de γ -CD-C₁₀ recouvertes de ligands de reconnaissance. Dans cette perspective, le greffage de fragments F(ab)' déjà utilisé avec succès dans le ciblage des érythrocytes infectés avec des liposomes (Owais *et al.* 1995) pourra être considéré. Une étude comparative d'efficacité dans le traitement des infections palustres pourra être réalisée par la suite avec les nanoparticules à temps de circulation vasculaire prolongée ciblant ou non les érythrocytes infectés.

Egalement, la toxicité des nanovecteurs devra être documentée chez l'animal. Cette évaluation est indispensable au développement de formes pharmaceutiques à base de ces nanovecteurs de CD bioestérifiées. Des études de toxicité en administration unique et en administration répétée devront être réalisées. Dans ce cadre, la tolérance animale pourra être appréciée sur des critères cliniques (comportement, poids, croissance,...), biologiques et anatomopathologique. Les signes d'hépatolyse devront être recherchés en particulier dans cette évaluation, en raison de la forte accumulation hépatique de ces nanovecteurs. La dose létale 50 % (DL50) et la dose maximale sans effet toxique (ou dose maximale tolérée) des nanoparticules blanches (sans ART) et des nanoparticules chargées en ART devront également être déterminées.

ANNEXES

1. Développement et évaluation de la qualité des méthodes analytiques de dosage de l'artémisinine

Les procédés analytiques utilisés dans notre étude ont été développés ou adaptés en examinant différentes méthodes analytiques et techniques spécifiques de dosage de l'ART. Il s'est agi surtout de rechercher des conditions analytiques optimales adaptées pour le dosage de l'ART dans différentes matrices (solutions aqueuses, solutions huileuses, suspensions colloïdales...) utilisées au cours du développement des formulations.

Une méthode de quantification en CLPH-UV a été initialement mise au point (méthode I). Cette méthode implique l'utilisation d'équipements disponibles dans presque tous les pays d'Afrique et a été reproduite facilement et utilisée au Burkina Faso pour certaines évaluations (biologiques) qui y ont été réalisées. Cependant, sa mise en œuvre est longue et fastidieuse surtout en présence d'un nombre important d'échantillons à analyser. Par conséquent, une méthode complémentaire plus rapide a été mise au point envisagée en supplément. Il s'agit de la CLHP couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL). Cette seconde méthode (méthode II) est plus spécifiquement mise en œuvre dans le cadre des essais de dissolution et de pharmacocinétique, où plusieurs prélèvements sont réalisés à différents temps.

Méthode de dosage CLHP-UV (Méthode I)

L'ART est un produit qui absorbe très faiblement dans l'UV. Une procédure de dérivation est donc utilisée pour permettre sa détection en UV tout en assurant une limite de quantification (LOQ) adéquate.

La méthode de conversion préalable de l'ART développée par Zhao (1987) a été utilisée et adaptée dans notre étude. Cette procédure implique l'hydrolyse alcaline de l'ART par un excès d'hydroxyde de sodium suivi de la conversion du produit hydrolysé en un composé absorbant fortement en UV (260 nm) appelé Q260. La procédure, ainsi que le schéma de la réaction sont décrits dans l'article Yaméogo *et al.* 2012.

Pour la réaction de dérivation, 1 mL de l'échantillon contenant l'ART à analyser est introduit dans une fiole jaugée de 10 mL et compléter avec 4 mL de solution de soude à 0,2 %. Le mélange est incubé à 50°C pendant 30 min, puis ramené à la température ambiante en 10 min. Après refroidissement, 1 mL d'éthanol est ajouté puis le milieu est complété à 10 mL avec de l'acide acétique 0,2 N. Les échantillons ainsi dérivatisés sont ensuite filtrés sur

membrane en nylon de 0,22 μm . Le spectre d'absorption UV-vis de l'ART convertie en Q260 est présenté Figure 1.

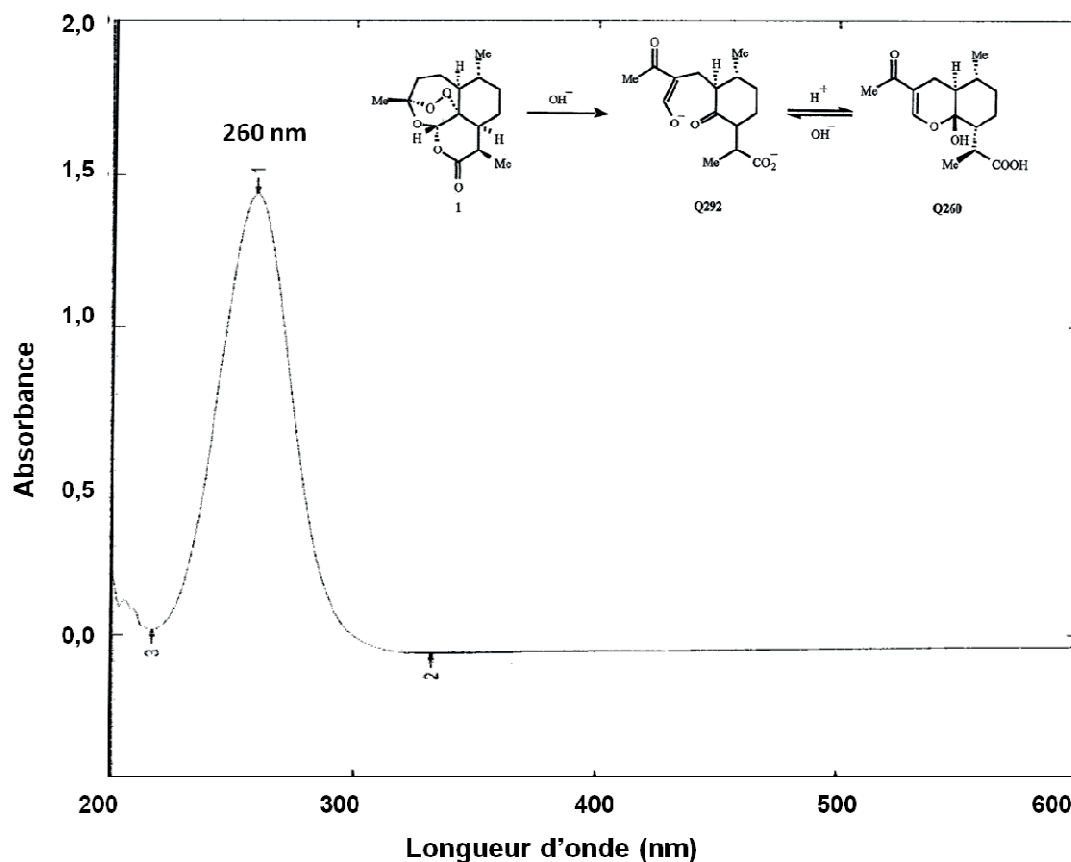


Figure 1 : spectre d'absorption UV-Visible de l'artémisinine convertie en Q260. Concentration = 50 $\mu\text{g/mL}$ (solvant = éthanol).

La longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) mesurée est de 260 nm, correspondant à celle rapportée par Zhao (1987).

Le dosage par spectrophotométrie UV sans séparation chromatographique préalable n'a pas été retenu dans notre étude du fait d'une interférence en chromatographie entre l'ART convertie en Q260 et le benzoate de benzyle (phase lipophile interne des nanoréservoirs). Cette interférence se traduit par un épaulement des pics d'absorption des deux substances. Le spectre d'absorption UV du benzoate de benzyle réalisé a montré que ce produit absorbe à une longueur d'onde maximale proche de celle de l'ART, expliquant ainsi les épaulements de pics.

Nous avons donc entrepris de quantifier l'ART convertie en Q260 en utilisant une méthode de dosage CLHP couplée avec une détection UV-vis. Une mise au point analytique avec le principe actif pur a été réalisée en optimisant les paramètres chromatographiques

tels que la nature et la température de la colonne, la nature et la composition de la phase mobile et du solvant de dissolution, le mode et le débit d'élution.

Les conditions chromatographiques ainsi que l'appareillage utilisé sont décrits ailleurs (Yaméogo *et al.* 2012). L'analyse CLHP est réalisée en phase inverse avec une colonne C₁₈ (250 x 4,6 mm ; 5µm), maintenue à une température de 35°C. Une élution isocratique de la phase mobile composée du mélange méthanol/tampon phosphate 0,05M pH 6,3 (45 : 55 v/v) a été réalisée à un débit de 1 mL/min. La longueur d'onde de détection est fixée à 260 nm. Dans ces conditions, nous avons obtenu des chromatogrammes avec un pic d'absorption de l'ART symétrique localisé à t = 9 min.

Afin de s'assurer de la qualité et de fiabilité des résultats, c'est-à-dire de s'assurer que la méthode utilisée conduit effectivement aux résultats attendus, nous avons utilisé des approches statistiques pour évaluer la méthode de dosage CLHP-UV.

Une gamme à six niveaux de concentration en ART ($K = 6$) comprise entre 10 à 60 µg/mL a été réalisée à partir de trois solutions mères d'ART préparées par solubilisation d'ART pure. Chaque niveau de concentration est injecté en triplicate. Cette gamme est finalement reproduite trois jours consécutifs. Comme on peut l'observer sur la figure 2, à tous les points, des variations apparentes inter-jours des mesures n'ont pas été observées.

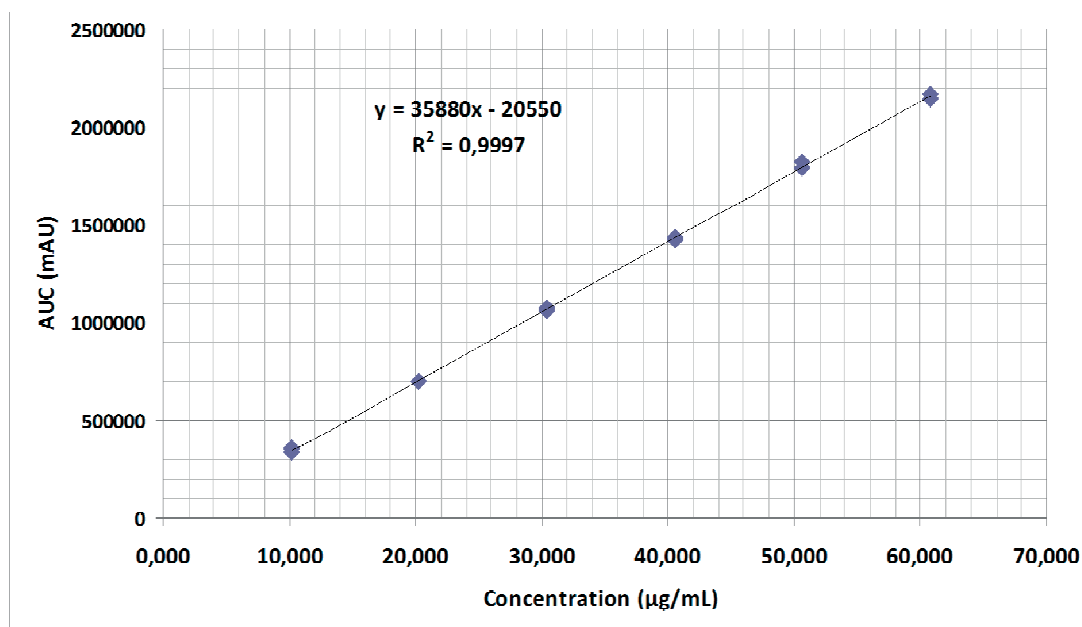


Figure 2 : droite de régression corrigée en CLHP-UV de l'ART converti en Q260 avec une gamme de concentration de 10 à 60 µg/mL.

Pour permettre l'utilisation de cette droite de régression, une évaluation par des tests statistique a été réalisée. Un test de Student montre que l'ordonnée à l'origine n'est pas statistiquement différent de zéro ($p = 0,5 > 0.001$). L'analyse de variance (ANOVA) du modèle montre l'existence d'une pente significative et l'absence de manque d'ajustement linéaire au seuil de 5 % (Tableau I).

Tableau I : ANOVA du modèle de régression.

Test statistique	Valeur critique	Valeur mesurée	Comparaison des valeurs	Interprétation
Test F de l'existence d'une pente b significative	$F_{crit} = 8,53$	$F = 59399$	$F > F_{critique}$	La variance expliquée par la régression est significative devant la variance résiduelle ($p = 5.10^{-30} < 0,01$). Pente a = 0.99973 significative
Test F de validité du manque d'ajustement linéaire	$F_{crit} = 14,37$	$F_{lof} = 13,449$	$F_{lof} < F_{critique}$	La variance due au manque d'ajustement n'est pas significative devant la variance expérimentale pure ($p = 0.0113 > 0,01$). Droite de régression significative

La figure 3 montre que les pourcentages de déviation standard relative (RSD) observés sont très faibles sur tous les points de la gamme et largement inférieures au seuil de 5 %. Les RSD varient de 0,39 % aux fortes concentrations à 2,3 % aux basses concentrations.

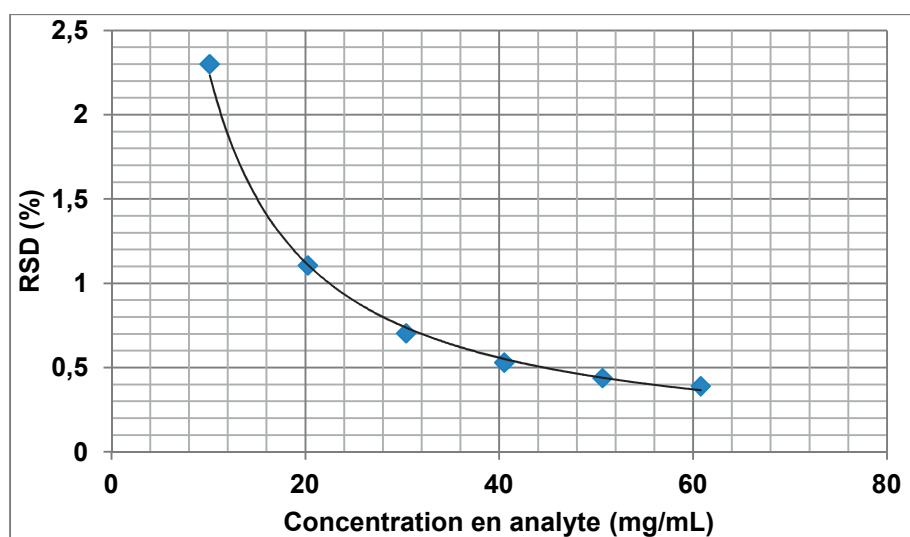


Figure 3 : profil de déviation standard relative (RSD) du dosage de l'ART par la méthode CLHP-UV.

Nous avons calculé la sensibilité et le domaine d'utilisation de la méthode CLHP-UV de dosage de l'ART à travers la détermination de la limite de détection (LOD) et de la limite de quantification (LOQ) aux RSD de 2, 5 ou 10 % en utilisant les équations suivantes (*Epshtein N.A, Pharmaceutical Chemistry Journal 2002 36(11) 631-633*) :

$$LOD = b + 3 \times s_{x/y} = b + 3 \times \sqrt{\frac{\sum (y_i - \eta_i)^2}{n-2}}$$

$$LOQ = 3,3 \times LOD$$

Les LOD et LOQ sont calculées à partir de la droite de régression linéaire comme étant le signal équivalent à 3 fois et 10 fois le bruit de fond chromatographique, respectivement. Le tableau II donne les valeurs de LOQ et LOD calculé, en fonction des RSD.

Tableau II : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) de la méthode HPLC-UV de dosage de l'ART.

RSD (%)	LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
2	11,513	3,489
5	4,562	1,382
10	2,265	0,686

Après la répétabilité, nous nous sommes assuré que dans une matrice complexe contenant les excipients de formulation et/ou le milieu réactionnel de la réaction de dérivatisation, il n'ya pas d'interférence avec l'ART. Cette évaluation est réalisée en injectant dans les mêmes conditions chromatographiques de dosage de l'ART, différentes solutions ne contenant pas d'ART. Les solutions testées sont : l'éthanol (solvant de l'ART dans la réaction de dérivatisation), une solution de nanosphères et de nanoréservoirs blanches (sans ART) dans l'éthanol. Ces solutions ont été traitées selon le processus de dérivatisation de l'ART et dans les mêmes conditions opératoires. Aucun spectre n'a été observé pendant le temps d'analyse, sauf dans le cas des solutions de nanoréservoirs ou un pic est visible après 3 minutes d'élution. L'injection du benzoate de benzyle solubilisé dans l'éthanol à la même concentration que celle retrouvée dans les nanoréservoirs a permis de constater que ce pic d'élution correspond à celui du benzoate de benzyle qui constitue la phase lipophile interne des nanoréservoirs. Le temps de rétention en CLHP-UV du benzoate de benzyle (3 minutes) est proche de celui du volume mort et différent de celui de l'ART (9 minutes). Cela suppose que le benzoate de benzyle n'interférera avec l'ART dans les conditions de dosage en CLHP-UV. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé dans les mêmes conditions chromatographiques et de dérivatisation, les temps de rétention, les symétries et les amplitudes (aire sous la courbe, AUC) des pics de l'ART et du benzoate de benzyle. Nous avons réalisé des injections indépendantes de solutions éthanoliques de benzoate de benzyle, de suspension de nanosphères et de suspensions de nanoréservoirs blanches auxquelles la même quantité d'ART a été ajoutée. Les temps de rétention, les symétries des pics ainsi que les AUC de l'ART et du benzoate de benzyle dans ces solutions ont été

comparés à ceux de des solutions standards d'ART et de benzoate de benzyle aux mêmes concentrations. Aucun changement n'a été observé dans tous les cas, confirmant ainsi notre hypothèse. La méthode de dosage CLHP-UV peut donc être utilisée pour le dosage de l'ART dans les suspensions colloïdales à base de CDs modifiées, avec la garantie que le signal mesuré provient exclusivement de l'ART.

La technique de dosage de l'ART en CLHP avec détection UV-vis après dérivation, adaptée de celle de Zhao montre une bonne linéarité, une bonne précision, une excellente stabilité et une bonne spécificité pour la quantification de l'ART dispersée dans les suspensions colloïdales.

Méthode de dosage CLHP-DEDL (Méthode II)

L'utilisation de l'analyse CLHP avec en détection DEDL permet de s'affranchir des coefficients d'extinction molaire et d'avoir une réponse indépendante de la nature de la molécule. Le principe de ce détecteur est fondé sur l'évaporation partielle des solutions en sortie de colonne. Le brouillard de particules formé avec un nébuliseur traverse un faisceau lumineux et la lumière diffusée sous un angle déterminé est détectée par un photomultiplicateur. La détection dépend de la taille des particules diffusant la lumière. Cette méthode est limitée à l'emploi de phases mobiles volatiles et d'analytes moins volatils.

L'examen de plusieurs technique CLHP avec détection en DEDL utilisée dans la littérature pour le dosage de l'ART nous a permis de retenir la méthode décrite par Avery *et al* (1999) parce qu'elle utilise une phase mobile qui convient bien à notre étude. Cette technique a été légèrement adaptée pour répondre au mieux aux conditions de notre étude.

Les conditions chromatographiques optimisées ainsi que l'appareillage utilisé sont également décrits dans l'article Yaméogo *et al.* 2012. L'analyse est réalisée également en phase inverse avec une colonne C₁₈ (250 x 4,6 mm ; 5µm). La température du détecteur est fixée à 32°C, la pression du gaz à 2,2 bars et le signal du gain à 12. Le débit d'élution de la phase mobile composée du mélange méthanol/eau (70 : 30 v/v) est de 1 mL/min. Le temps de rétention de l'ART est de 11,9 minutes avec des pics d'absorption chromatographiques parfaitement symétriques (Figure 4).

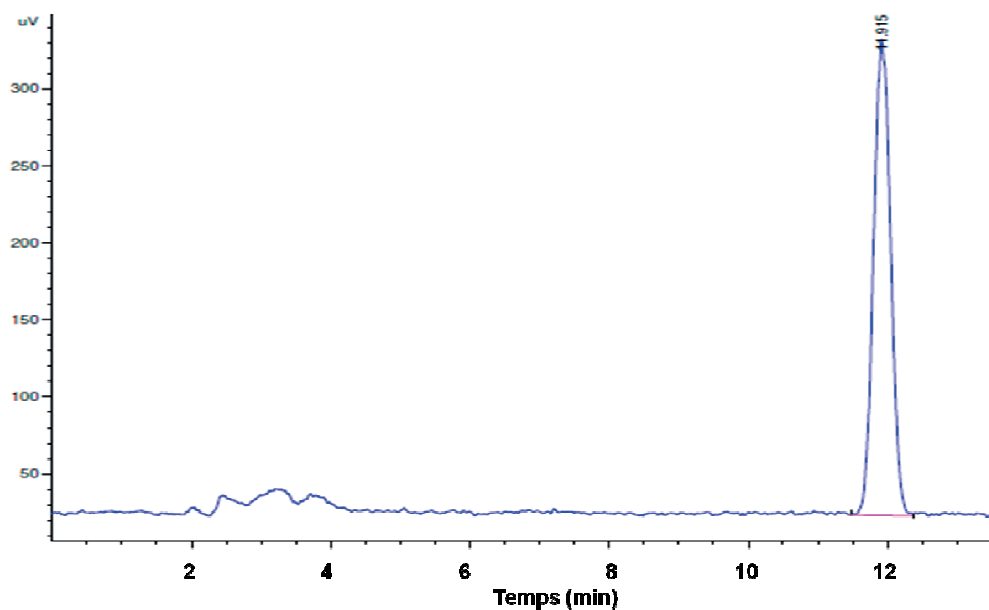


Figure 4 : Profil chromatographique CLHP-DEDL de l'ART à la concentration de 50 µg/mL dans le méthanol.

La qualité de la méthode de dosage CLHP-DEDL de l'ART est évaluée à l'aide de la même approche statistique utilisée précédemment.

Pour le modèle de régression linéaire, une gamme à sept niveaux de concentration en ART comprise entre 5 à 105 µg/mL a été réalisée dans le méthanol à partir de trois solutions mères d'ART. Chaque niveau de concentration a été analysé trois fois. La réponse en DEDL est sigmoïdale. La droite de régression ($y = 1,6569x + 0,8847$) obtenue après linéarisation logarithmique (log) des AUC mesurées et des concentrations (Figure 5) démontre d'une bonne linéarité avec une valeur du coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,9937$.

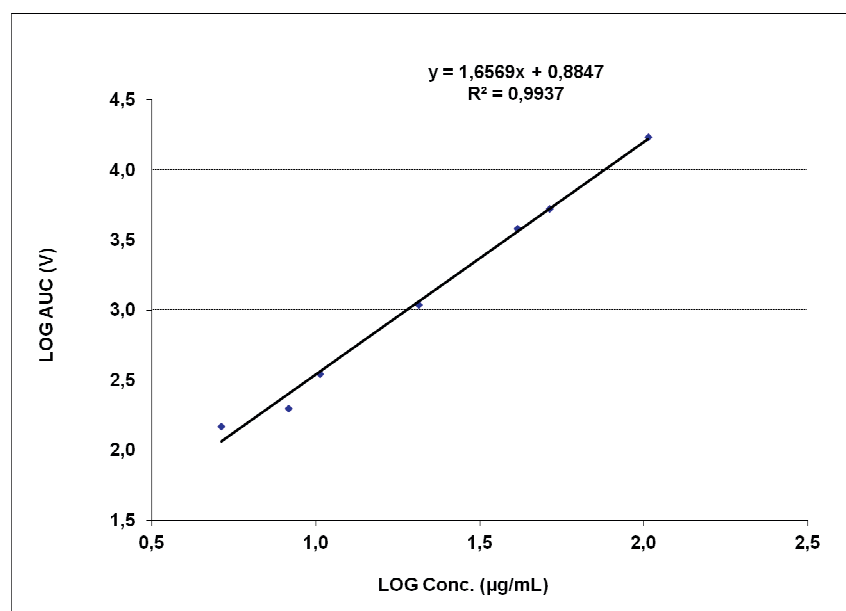


Figure 5 : Droite de régression linéaire logarithmique de l'ART en CLHP-DEDL avec une gamme de concentration de 5 à 105 µg/mL dans le méthanol.

L'essai de spécificité a montré l'absence d'interférence au niveau des pics correspondants à l'ART (temps de rétention, symétrie et AUC) et aux autres constituants des formulations, lesquels étaient là encore éludés avec une résolution satisfaisante. Cette méthode ayant été utilisée pour l'étude de pharmacocinétique chez le rat, d'autres matrices ont été également évaluées. Il s'agit du plasma du rat, du pentobarbital (utilisé pour anesthésier les rats) et de l'héparine. Là encore les tests ont montré une absence d'interférence en chromatographie.

L'essai de répétabilité est réalisé à partir des sept niveaux de concentration en ART, analysés trois fois dans la même série. La concentration minimale quantifiable (LOQ) est de 2,8 µg/mL. Une LOQ similaire a peu près similaires (3 µg/mL) avait été rapportée par Avery *et al* (1999).

D'après ces paramètres, nous pouvons affirmer que la technique CLHP-DEDL optimisée convient également au dosage de l'ART dans les suspensions colloïdales, après dilution dans du méthanol. Elle permet une quantification rapide de l'ART en routine, sans dérivation préalable.

2. Evaluation de la solubilité de l'artémisinine dans différents milieux

Cette évaluation avait pour but de permettre la sélection des solvants qui conviendraient au mieux à notre étude. Egalement, elle a permis de choisir la meilleure phase lipophile interne des nanoréservoirs permettant de maximiser la prise en charge de l'ART par les nanosystèmes. Ainsi, nous avons déterminé la solubilité de l'ART à la température ambiante et/ou à 37 °C (bain thermostaté) dans différents milieux : eau distillée, tampon phosphate sodique (PBS) pH 7,4, éthanol, méthanol, acétone, benzoate de benzyle et Miglyol® 812N (triglycérides à chaînes moyennes).

Concrètement, la substance active est dispersée à saturation sous agitation magnétique de 500 tours/min pendant 2 h dans un volume de solution donné. Le mélange est ensuite filtré sur filtre PVDF de 0,22 µm pour séparer les particules de principe actif non dissoutes. La quantité d'ART dispersée à l'état moléculaire dans la solution est dosée en utilisant la méthode CLHP-UV. Tous les essais de solubilisation et de dosage sont répétés trois fois. Les résultats sont présentés au tableau III.

Tableau III : solubilité de l'ART dans différentes solutions à 25°C ou à 37 °C

Solutions testées	Température (°C)	Solubilité (mg/mL)
Eau distillée	25	0,064
Eau distillée	37	0,098
PBS 0,1 M, pH 7,4	37	0,092
Ethanol	25	12,20
Méthanol	25	14,52
Acétone	25	86,71
Miglyol® 812 N	25	23,05
Benzoate de benzyle	25	83,30

3. Évaluation de la stabilité chimique de l'Artémisinine en solution

Cette évaluation avait pour but de déterminer la cinétique de dégradation de l'ART lorsqu'elle est mise en solution ou lorsqu'elle est utilisée dans les formulations.

Nous avons déterminé la stabilité de l'ART durant trente jours dans les différents milieux utilisés dans notre étude et ce, dans les conditions de température d'utilisation de ces milieux.

L'évaluation de la stabilité de l'ART dans l'éthanol (milieu utilisé dans la réaction de dérivatisation de l'ART) à la température ambiante, puis à 4°C (au réfrigérateur) a permis de déterminer les délais d'utilisation des solutions éthanoliques contenant l'ART et d'identifier les conditions idéales de conservation de ces solutions stocks.

La stabilité de l'ART dans le benzoate de benzyle (phase lipophile interne des nanoréservoirs) et dans l'eau distillée (phase externe des suspensions colloïdales) a été également évaluée à la température ambiante, puis à 4°C afin d'identifier des conditions appropriées de conservation des formulations contenant l'ART.

Enfin, nous avons déterminé la stabilité à 37°C de la substance active solubilisée dans les milieux aqueux utilisés dans les essais de libération (eau distillée et PBS pH 7,4).

Pour toutes ces évaluations nous avons utilisé des solutions d'ART à des concentrations correspondantes aux 2/3 de la concentration à saturation du principe actif dans chaque milieu. Les solutions ont été conservées dans des flacons hermétiquement fermés dans les conditions sus spécifiées. A des intervalles de temps réguliers, des prises d'essai étaient effectuées et la concentration en ART déterminée en triplicate en utilisant la méthode de dosage CLHP-UV.

Les résultats montrent que l'ART est stable en milieux aqueux et dans le BB dans les conditions de conservation étudiées. Par contre, il semble y avoir une dégradation du principe actif allant jusqu'à 10 % de perte à partir du 15^{ème} jour et 20 % au 30^{ème} jour avec les solutions éthanoliques d'ART conservées à la température ambiante (Figure 6). Cependant, cette cinétique de dégradation de l'ART est ralentie lorsque la solution éthanolique est conservée au réfrigérateur (4°C).

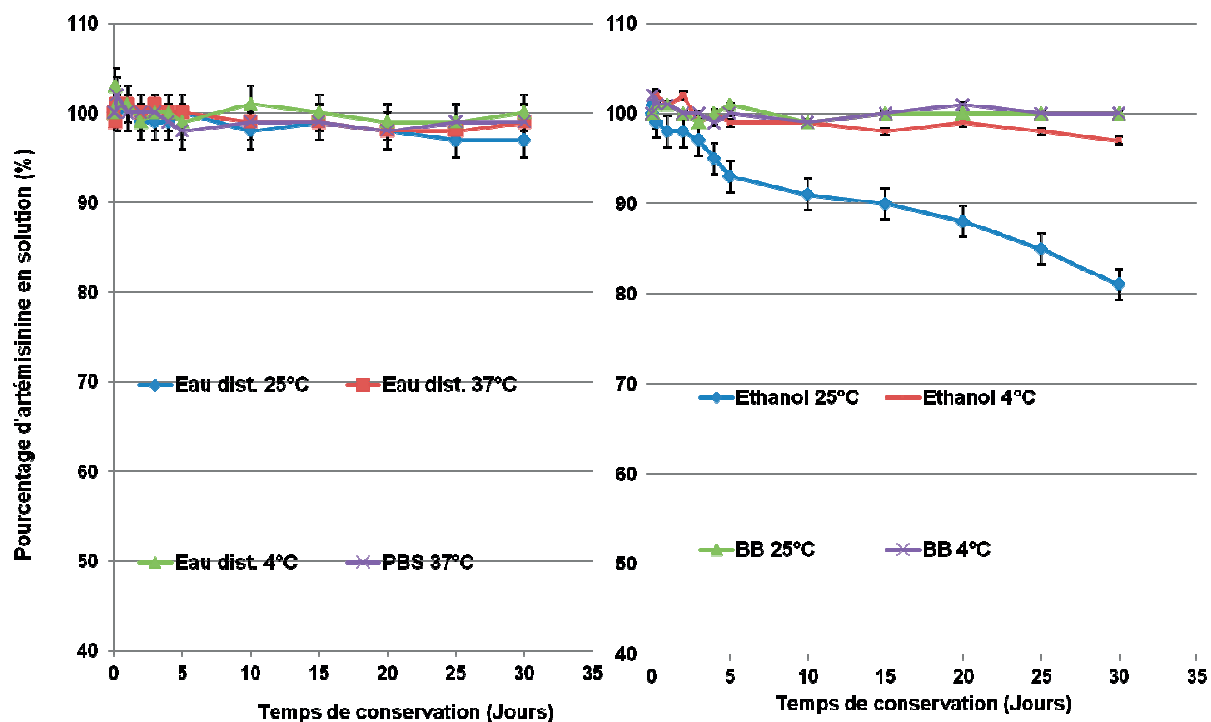


Figure 6 : Stabilité de l'artémisinine en solution pendant 30 jours.

L'ART reste stable dans le benzoate de benzyle jusqu'à au moins soixante jours (données non présentées sur la figure).

Prenant en compte ces résultats de stabilité, toutes les solutions stocks éthanoliques d'ART ont été analysées immédiatement ou conservées au réfrigérateur (4°C) au plus une semaine avant l'analyse.

Ces données de stabilité obtenues supposent que les suspensions colloïdales contenant l'ART peuvent être conservées indifféremment à la température ambiante ou au réfrigérateur, sans risque majeur de dégradation du principe actif. Ceci a été confirmé avec les essais de conservation des suspensions colloïdales.

4. Détermination du coefficient de partage du principe actif

Le coefficient de partage est une constante thermodynamique d'équilibre définie à une température et à un pH donné. C'est une propriété physicochimique importante qui peut être utilisée pour représenter la nature lipophile ou hydrophile d'une molécule.

Les coefficients de partage de l'ART (coefficient de partition n-octanol/eau et coefficient de partition benzoate de benzyle/eau) ont été déterminés à 37°C à pH 7,4.

Typiquement, 2,5 mg d'ART sont dispersés sous agitation dans 25 mL de n-octanol ou de benzoate de benzyle. Après 2 h d'agitation, on ajoute 25 mL de PBS à chaque phase lipophile et on laisse agiter pendant 2 h supplémentaires. Les différentes phases sont ensuite séparées par centrifugation (2500 tours/min pendant 10 minutes) puis filtrés et la teneur en principe actif déterminée dans chaque phase par CLHP-UV. Chaque essai est triplé.

Le coefficient de partage est le logarithme de base 10 du rapport de la concentration d'ART dans la phase lipophile sur sa concentration dans la phase aqueuse. Il est déterminé comme suit :

- Coefficient de partage octanol/eau : $\log P_{oct} = \log (C_{octanol}/C_{eau})$
- Coefficient de partage BB/eau : $\log P_{benzoate\ de\ benzyle} = \log (C_{benzoate\ de\ benzyle}/C_{eau})$

Les valeurs de coefficients de partage de l'ART déterminées à 37°C à pH 7,4 sont :

$$\log P_{oct} = 2,95 \pm 0,06$$

$$\log P_{benzoate\ de\ benzyle} = 2,78 \pm 0,11$$

5. Synthèse enzymatique des cyclodextrines amphiphiles

L'approche de synthèse par voie enzymatique développée dans l'équipe est utilisée. Il s'agit de la trans-estérification de la CD mère, catalysée par une métallo-enzyme, la thermolysine immobilisée sur célite mettant en jeu un ester de vinyle et d'acide gras comme donneur de groupement alkyle. Concrètement, pour le cas des dérivés des dérivés de CD décanoate, la synthèse est réalisée comme suit :

La célite (10 g) est régénérée sous agitation magnétique pendant 6 heures à 80 °C par 100 mL d'acide nitrique à 15M. L'acide est ensuite éliminé par filtration et la célite est rincée abondamment à l'eau désionisée jusqu'à atteindre un pH stable proche de la neutralité, puis mise à l'étuve à 100°C pendant une nuit pour être séchée.

La thermolysine (100 mg) est mise en présence de 5 mL de tampon MOPS/Na (50mM, pH=7,5) à 20°C. On ajoute au mélange, 1g de célite régénérée et le tout est soumis à une agitation à température ambiante. Après 4 heures d'agitation, la phase liquide, est éliminée sous pression réduite à 25°C. La thermolysine immobilisée obtenue en fin d'étape est immédiatement utilisée.

La synthèse et la purification sont réalisées selon la technique de biocatalyse. La CD séchée (0,09M) est solubilisée dans le DMSO (7,2 mL) sous agitation magnétique. Dès solubilisation complète, la thermolysine immobilisée et le décanoate de vinyle (1M) sont additionnés au milieu réactionnel, toujours dans les mêmes conditions d'agitation. La fin de la réaction d'estérification qui se produit dans le milieu est caractérisée par l'homogénéisation complète, soit après 72 h. L'enzyme est éliminée par la suite du milieu réactionnel par centrifugation à 1500 tours/min pendant 15 min. Le surnageant est récupéré et les esters de CD qui s'y trouvent sont précipités par addition de 20 mL d'une solution de MeOH/H₂O (35:65, v/v) et séparés par centrifugation à 2000 tours/min pendant 15 min. Le précipité est d'abord solubilisé dans environ 25 g du THF puis on y ajoute environ 40 mL d'un mélange ACN/H₂O (90:10, v/v). Le tout est stocké dans une chambre froide pendant 2 heures pour favoriser la formation de cristaux qui seront séparés par la suite par filtration sur papier. Ces cristaux sont une fois de plus solubilisés dans du THF, puis précipité par le mélange ACN/H₂O (90:10). Le THF sera éliminé sous pression réduite et le précipité, filtré sur papier. Cette étape de solubilisation/précipitation/évaporation sera répétée trois fois afin d'éliminer les traces de DMSO et de décanoate de vinyle résiduel. A la dernière étape, les esters d'acide gras de CD décanoate sont enfin séchés sous pression réduite et stockés à la température du laboratoire.

Des contrôles sans enzyme sont réalisés dans les mêmes conditions de réaction et montrent l'absence d'estérification des CD mères.

6. Méthode CLHP de caractérisation des CD biosynthétisés

La méthode CLHP développée pour la caractérisation des produits biosynthétisés est réalisée de la manière suivante :

A la fin de la réaction d'estérification, juste avant l'étape de purification, un volume déterminé de surnageant de centrifugation est prélevé et la teneur en décanoate de vinyle (DV) résiduel est déterminée par CLHP.

Cette mesure permet de déterminer le pourcentage de conversion du DV et d'apprécier l'efficacité de la synthèse. Elle est réalisée par utilisation d'une unité CLHP Shimadzu® composée d'une pompe SCL-10AVP et d'un détecteur SPD-M10A VP UV-Diode dont la longueur d'onde de détection est fixée à 203 nm. Une Colonne C-18 Nucléosil (250 x 4,6 mm ; 5 µm) InterChim® est utilisée à température ambiante comme phase stationnaire et la phase mobile, constituée du mélange méthanol/eau distillée (95:5 v/v) est éluée en mode isocratique à un débit de 0,7 mL/min. 10 µL d'échantillon, préparé par solubilisation de 100 mg du résidu de synthèse prélevé dans 25 mL de THF, sont injectés manuellement afin de déterminer la teneur en DV.

Nous avons réalisé d'abord une droite de régression avec le DV pur dans le but de déterminer les coefficients du modèle de régression linéaire. Six standards de calibration du DV (0,085 à 1,015 mg/mL) ont été préparés et analysés trois fois sur trois jours. Des standards indépendants ont également été réalisés avec les mêmes niveaux de concentration en DV dans le milieu réactionnel de la synthèse. Le chromatogramme du DV en CLHP ainsi que la droite d'étalonnage obtenue sont présentés aux figures 7 et 8.

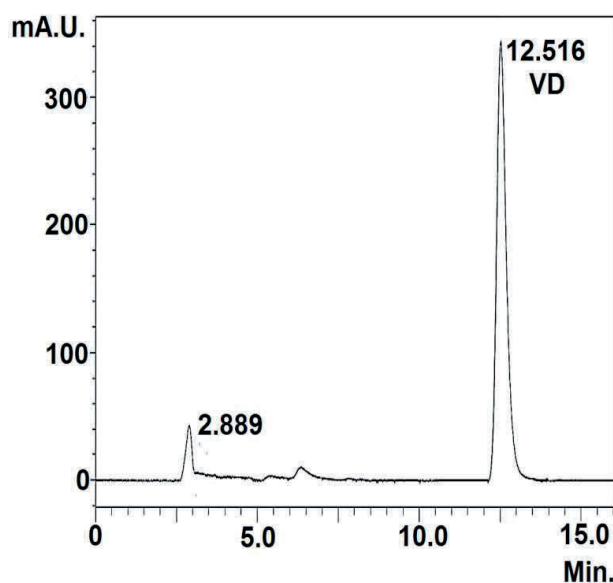


Figure 7 : Profil chromatographique CLHP du décanoate de vinyle (DV).

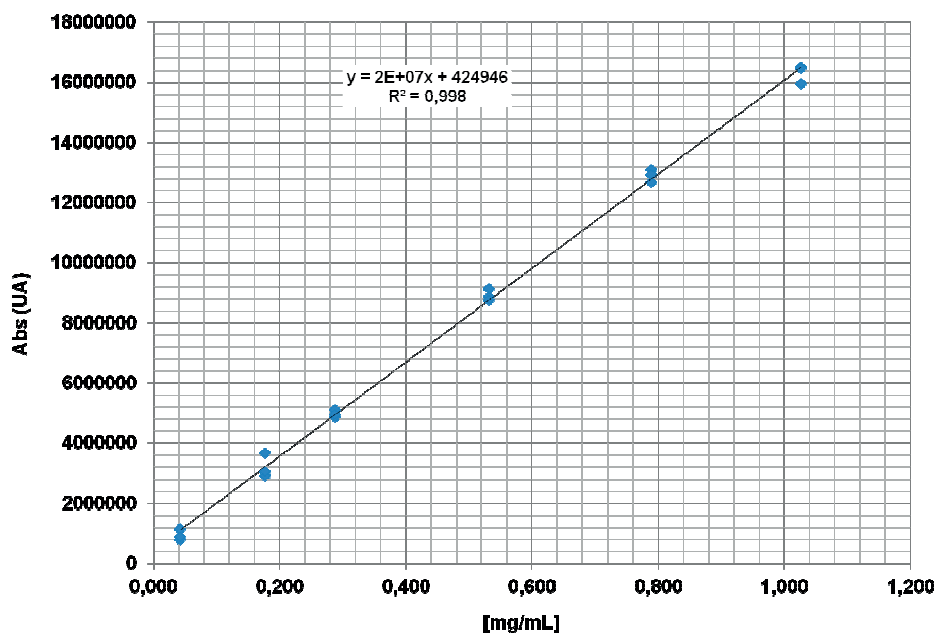


Figure 8 : Droite de régression linéaire du décanoate de vinyle (0,085 à 1,015 mg/mL) en CLHP.

Les résultats des tests statistiques de validation (choisnard *et al.* 2011) ont montré que la droite d'étalonnage est valide et peut être utilisée pour la détermination des concentrations en DV dans le résidu de synthèse.

Les paramètres caractéristiques de l'efficacité de la synthèse, déterminés après le dosage du DV dans le résidu de synthèse sont :

- Le pourcentage de conversion du décanoate de vinyle,
- Le taux de substitution moyen par molécule de CD (TDS),
- La masse moléculaire (M_w) moyenne des CD acylés.

Ces paramètres sont calculés à partir des équations suivantes :

$$\text{Taux de substitution moyen (TDS)} = ([DV]_i - [DV]_f) / [CD]_i$$

$$\text{Masse moléculaire moyenne (Mw)} = M_{CD} + 154 \times \text{TDS}$$

$[DV]_i$ = concentration de DV initialement introduite dans le milieu réactionnel,

$[DV]_f$ = concentration en DV qui n'a réagi (dosé dans le résidu de synthèse),

$[CD]_i$ = concentration de CD mère initialement introduite dans le milieu,

M_{CD} = masse molaire de la CD mère,

154 = masse molaire du résidu ester – masse molaire de l'atome du proton

éliminé du squelette de CD durant la réaction de transestérification

7. Diffusion des rayons X aux petits et grands angles (SAXS et WAXS)

Les expériences de diffusion des rayons X (DRX) aux petits angles sont réalisées sur la ligne BM02 (D2AM) du CRG français. Les clichés de diffraction sont enregistrés à partir de suspensions à 10 mg.mL^{-1} placées dans des capillaires de verre de 1,5 mm de diamètre, à une énergie de 8 keV ($\lambda=1,554 \text{ \AA}$) ou 16 KeV ($\lambda= 0.776 \text{ \AA}$). Le détecteur CCD est placé à une distance de 20-25 cm des spécimens afin d'explorer des domaines de q ($0,1$ à $0,6 \text{ \AA}^{-1}$) correspondant à l'ultrastructure des nanoparticules. Des temps de pause de 50 et 300 s sont utilisés. Les clichés sont calibrés au moyen d'un standard de behenate d'argent.

Les nanoparticules ont également soumises à des traitements thermiques (cycles de chauffage refroidissement) dans le but d'évaluer leur stabilité thermique. Dans cette expérience, les capillaires sont scellés à la flamme et placés dans un passeur chauffant (Figure 9). Les capillaires sont ensuite chauffés par pas de 10°C , à une vitesse d'environ $3^\circ\text{C}/\text{min}$, depuis la température ambiante jusqu'à 180°C . Tous les 10°C , les spécimens sont maintenus à température constante durant 10 min afin d'enregistrer les clichés de la série de capillaires. Les suspensions sont chauffées jusqu'à 130°C , refroidies à température ambiante puis chauffées à nouveau jusqu'à 160°C .

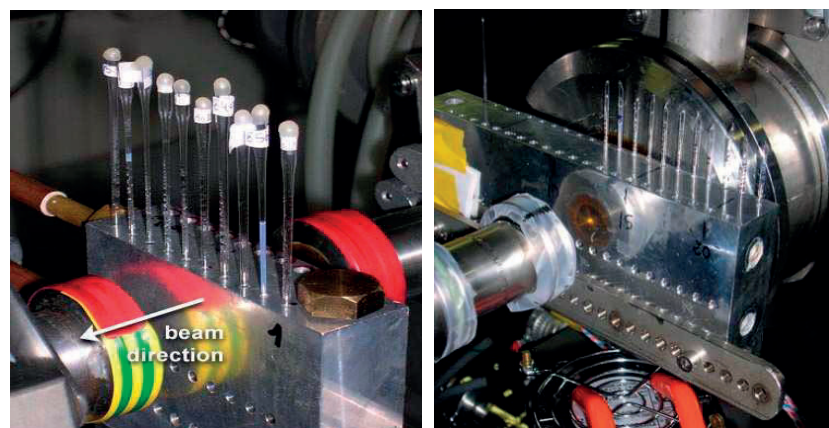


Figure 9 : Passeurs automatiques d'échantillons : à gauche, passeur contenant des capillaires bouchés par de la cire pour les traitements à température ambiante ; à droite, passeur d'échantillons chauffant contenant des capillaires scellés.

8. Protocole de l'étude de pharmacocinétique

Un document de saisine à été adressé au Comité d'éthique (Com-Eth) en expérimentation animale de Grenoble et a obtenu un accord favorable.

Des rats Wistar mâles âgés d'au moins 8 semaines et pesant en moyenne 300 g (280-340 g) obtenus d'un éleveur agréé (Etablissement Janvier, Le Genest saint Isle, France) sont utilisés. A leur arrivée, les rats sont mis en stabulation durant une semaine afin qu'ils s'acclimatent aux conditions de l'animalerie (nourriture, température : $21\pm 1^\circ\text{C}$, hydrométrie et cycle jour/nuit : 12h/12h). A l'issue de cette stabulation, les rats sont répartis dans des cages en fonction de leur poids de manière randomisée en trois groupes expérimentaux. Pour chaque groupe expérimental, les animaux sont réparties en trois groupes de prélèvement dénommés P1, P2 et P3.

Le nombre d'animaux utilisé (72 rats au total) est déterminé sur la base du nombre de formulations à tester (3 formulations en raison d'une formulation par groupe expérimental), du nombre d'essai réalisé par formulation (8 essais) et du nombre de rats utilisé par essai (3 rats en raison d'un rat par groupe de prélèvement).

Trois formulations rendues isotoniques par addition de glucose sont testées en raison d'une formulation par groupe expérimental :

- groupe 1 : nanoréservoir γ -CD- C_{10} /polysorbate 80 contenant l'ART = 1,5 mg/mL,
- groupe 2 : nanosphères γ -CD- C_{10} /DMPE-mPEG 2000 contenant l'ART = 0,48 mg/mL,
- groupe 3 (groupe témoin) : solution d'ART (1,5 mg/mL) dans de l'éthanol (10% v/v).

Après la semaine de stabulation, les animaux sont pesés individuellement. Les animaux des groupes de prélèvement P1 sont anesthésiés au pentobarbital (injection intra péritonéale d'une solution à 54,7 mg/mL en raison de 50 mg/kg en induction, puis de 5 mg/kg en cas de signe de réveil de l'animal). L'animal anesthésié est placé en décubitus dorsal et un cathéter stérile connecté à une seringue est insérée dans l'artère carotide droite dans des conditions aseptiques. Les cathéters sont remplis d'une solution de sérum physiologique hépariné (héparine Choay[®] 25 000 UI/5 mL, Laboratoire Léo, France) pour empêcher leur obstruction. Les formulations contenant l'ART sont ensuite administrées par la veine caudale (administration unique rapide pendant 1 min) à la dose de 2 mg d'ART/kg de poids corporel (nanoréservoirs et solution hydro-éthanolique d'ART) ou de 1,5 mg/kg (nanosphères).

Les animaux des groupes de prélèvement P2 et P3 sont anesthésiés à l'isoflurane (Nicholas Piramal, London, 4 % en induction puis 1,5 % en entretien) puis les formulations

sont administrées au niveau de la veine caudale à la même dose que précédemment. Après injection, les animaux sont réveillés et remis dans leurs cages ou ils reprennent une activité normale dans les conditions de nourriture, de température et d'hydrométrie de l'animalerie. 6 h (groupe P2) ou 24 h (groupe P3) après l'injection, les animaux sont anesthésiés au pentobarbital (injection intra péritonéale, solution à 54,7 mg/mL, 50 mg/kg en induction, puis de 5 mg/kg en cas de signe de réveil de l'animal). Un cathéter est implanté dans l'artère carotide dans les mêmes conditions que précédemment.

Les prélèvements sanguins sont réalisés au moyen du cathéter mis en place dans l'artère carotide. Le sang (600 µl), est recueilli dans des tubes héparinés à des intervalles de temps fonction du groupe de prélèvement : avant injection des formulations, et aux temps 5, 15, 60 et 120 min après l'injection pour le groupe P1 ; 6 et 8 h après l'injection pour le groupe P2 et 24 h après l'injection pour le groupe P3. Le sang collecté est immédiatement centrifugé à 5000 tours/min pendant 10 min à +4°C, puis le plasma transféré dans des cryotubes pour être congelé à -20°C jusqu'à l'analyse. Afin de minimiser les risques d'hypovolémie, un volume équivalent (600 µL) de solution physiologique (NaCl 0,09 %) hépariné est administré après chaque prélèvement. L'hématocrite est également déterminé à chaque prélèvement afin de détecter une hémodilution éventuelle.

Les volumes de sang prélevé par rat du groupe P1 sont d'environ 3 mL soit moins de 20 % du volume sanguin total de l'animal. Les quantités de sang prélevé chez un rat en une fois ou pendant toute la durée de l'expérimentation, sont tolérées chez le rat, surtout que l'animal reçoit, suite au prélèvement sanguin, une solution de remplacement. Dans ces conditions, les prélèvements ne provoquent pas d'effets notables sur le volume d'éjection cardiaque ou la pression artérielle.

L'ART est quantifiée dans le plasma par utilisation de la méthode CLHP-DEDL après extraction préalable suivant une procédure décrite par Ashton *et al.* (1998). Concrètement, 300 µL de chaque échantillon de plasma est transféré dans un tube à essai dans lequel on y ajoute 600 µL de tampon phosphate (0,3 M, pH 3,5) et 60 µL d'eau oxygénée (H₂O₂) à 30 % pour faire précipiter les protéines. Les tubes sont plongés dans un bain de glace dans lequel ils sont soumis à agitation magnétique pendant 15 min avant l'extraction par 2,4 mL du mélange hexane/n-butanol (94:6 v/v). Les tubes sont ensuite centrifugés (5000 tours/min pendant 10 minutes à 4°C) puis 2 mL d'aliquot sont récoltés de la phase organique et évaporés à sec sous air comprimé. Le résidu sec est reconstitué dans 200 µL de méthanol, filtré sur filtre en nylon puis injecté au système analytique CLHP-DEDL.

Résumé : L'artémisinine (ART) est un composé antipaludique majeur très actif sur les souches multi-résistantes de *Plasmodium falciparum*. Cependant, son application clinique est limitée par sa faible solubilité en milieu aqueux et sa faible biodisponibilité par voie orale. La mise en œuvre de cyclodextrines (CDs) bioestérifiées et de dérivés amphiphiles polyoxyéthylénés permet de viser deux objectifs : i) d'une part d'améliorer la concentration aqueuse d'ART à travers son association aux vecteurs colloïdaux de CDs modifiées et ii) d'autre part d'améliorer sa biodisponibilité et son efficacité thérapeutique à travers la décoration de la surface des vecteurs. La décoration surfacique est sensée augmenter le temps de circulation sanguine des nanovecteurs de manière à maintenir des doses plasmatiques efficaces d'ART sur une longue période, suite à une administration intraveineuse. Des suspensions colloïdales stables suffisamment chargées d'ART ont été mises au point permettant de palier le problème d'insolubilité en milieu aqueux de la molécule active et donc d'envisager son administration par voie parentérale. Les essais de lyodisponibilité indiquent que l'ART est libérée des nanosystèmes pendant une période de 4 jours pour les nanoréservoirs et de 11 jours pour les nanosphères. En plus des caractérisations physico-chimiques et pharmacotechniques, les potentialités des nanoparticules décorées en surface ont été évaluées et comparées au cours de tests biologiques. *In vitro*, l'ART mise en forme a montré une bonne efficacité sur des souches plasmodiales chloroquino-sensibles (3D7) et chloroquino-résistantes (K1) avec des CI_{50} très faibles de l'ordre de 3 à 6 ng/mL. Le concept de co-nano-assemblage de dérivés amphiphiles de γ -CD- C_{10} bioestérifiée et de polyéthylène glycol (PEG) dans les conditions de nanoprécipitation semble être une approche intéressante pour conférer des propriétés de furtivité aux nano-systèmes de γ -CD- C_{10} . En effet, les études *in vitro* mettent en évidence une diminution significativement de la phagocytose par les cellules macrophagiques et/ou de l'adsorption des protéines du complément sérique à la surface des nanoparticules de γ -CD- C_{10} décorées par le polysorbate 80, le stéarate de PEG1500, et le DMPE-mPEG2000. *In vivo*, nous observons une augmentation du temps de circulation sanguine des nanoréservoirs γ -CD- C_{10} /polysorbate 80 et des nanosphères γ -CD- C_{10} /DMPE-mPEG2000. Enfin, les études de pharmacocinétique réalisées chez le rat montrent que les paramètres pharmacocinétiques de l'ART sont améliorés lorsqu'elle est associée aux deux systèmes nanoparticulaires précédents. En effet, des valeurs de clairance plasmatique très faibles et de temps de demi-vie plasmatique longs (3 et 5 heures, respectivement) de l'ART ont été enregistrées avec ces deux formulations. Ces formes vectorisées d'ART mises au point ouvrent de perspectives intéressantes pour la prise en charge thérapeutiques des crises de paludisme sévère.

Mots clés : paludisme, artémisinine, cyclodextrines bioestérifiées, polyéthylène glycol, nanoparticules, évaluations biologiques.

Résumé : L'artémisinine (ART) est un composé antipaludique majeur très actif sur les souches multi-résistantes de *Plasmodium falciparum*. Cependant, son application clinique est limitée par sa faible solubilité en milieu aqueux et sa faible biodisponibilité par voie orale. La mise en œuvre de cyclodextrines (CDs) bioestérifiées et de dérivés amphiphiles polyoxyéthylénés permet de viser deux objectifs : i) d'une part d'améliorer la concentration aqueuse d'ART à travers son association aux vecteurs colloïdaux de CDs modifiées et ii) d'autre part d'améliorer sa biodisponibilité et son efficacité thérapeutique à travers la décoration de la surface des vecteurs. Des suspensions colloïdales stables suffisamment chargées d'ART ont été mises au point permettant de palier le problème d'insolubilité en milieu aqueux de la molécule active et donc d'envisager son administration par voie parentérale. Les essais de lyodisponibilité indiquent que l'ART est libérée des nanosystèmes pendant une période de 4 jours pour les nanoréservoirs et de 11 jours pour les nanosphères. *In vitro*, l'ART mise en forme a montré une bonne efficacité sur des souches plasmodiales chloroquino-sensibles (3D7) et chloroquino-résistantes (K1) avec des CI_{50} très faibles de l'ordre de 3 à 6 ng/mL. Le concept de co-nano-assemblage de dérivés amphiphiles de γ -CD- C_{10} bioestérifiée et de polyéthylène glycol (PEG) dans les conditions de nanoprecipitation semble être une approche intéressante pour conférer des propriétés de furtivité aux nano-systèmes de γ -CD- C_{10} . En effet, les études *in vitro* mettent en évidence une diminution significativement de la phagocytose par les cellules macrophagiques et/ou de l'adsorption des protéines du complément sérique à la surface des nanoparticules de γ -CD- C_{10} décorées par le polysorbate 80, le stéarate de PEG1500, et le DMPE-mPEG2000. *In vivo*, nous observons une augmentation du temps de circulation sanguine des nanoréservoirs γ -CD- C_{10} /polysorbate 80 et des nanosphères γ -CD- C_{10} /DMPE-mPEG2000. Enfin, les études de pharmacocinétique réalisées chez le rat montrent que les paramètres pharmacocinétiques de l'ART sont améliorés lorsqu'elle est associée aux deux systèmes nanoparticulaires précédents. En effet, des valeurs de clairance plasmatique très faibles et de temps de demi-vie plasmatique longs (3 et 5 heures, respectivement) de l'ART ont été enregistrées avec ces deux formulations. Ces formes vectorisées d'ART mises au point ouvrent de perspectives intéressantes pour la prise en charge thérapeutiques des crises de paludisme sévère.

Mots clés : paludisme, artémisinine, cyclodextrines bioestérifiées, polyéthylène glycol, nanoparticules, évaluations biologiques.

Abstract: Artemisinin (ART) is a potent antimalarial drug. He has a fast action against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *P. falciparum*, making it very effective in the treatment of multidrug-resistant malaria. However, its poor aqueous solubility, short half-life and high first-pass metabolism limit its use in therapeutics. The purpose of the present study was to investigate the potential of self-assembled bio-transesterified cyclodextrin-based nanocarriers as ART delivery systems for an intravenous route. The objective was twofold: (i) to improve the ART dosage through its association with cyclodextrin esters-based nanocarriers, (ii) to ensure a sufficient blood circulation time of the nanocarriers through their surface decoration, which is a prerequisite to reach infected erythrocytes after systemic administration. Stable colloidal suspensions with good ART association rate (95 %) were developed. ART-loaded nanodevices exhibited a sustained release profile over 4 (nanoreservoirs) or 11 days (nanospheres). All the formulations inhibited the growth of cultured *Plasmodium falciparum*, both multi-resistant K1 and susceptible 3D7 strains with IC_{50} values (3 and 6 $ng.mL^{-1}$) comparable to those of reference ART solution. The concept of co-nano-assemblage of γ -CD- C_{10} and amphiphilic polyethylene glycol (PEG) derivatives seems to be an interesting approach to impart stealth properties to cyclodextrin-based nanosystems. Indeed, the *in vitro* assessments showed that plasma proteins adsorption and phagocytosis by macrophage cells triggered by non-decorated γ -CD- C_{10} nanovecteurs can be significantly reduced with γ -CD- C_{10} nanoparticles decorated by polysorbate 80, PEG1500 stearate, and mPEG2000-DMPE. *In vivo*, prolonged blood circulation times were evidenced with γ -CD- C_{10} /polysorbate 80 nanoreservoirs and γ -CD- C_{10} /DMPE-mPEG2000 nanospheres. Finally, a comparative pharmacokinetic study was carried out on healthy rat after a single iv administration. ART-loaded DMPE-mPEG2000/ γ -CD- C_{10} nanospheres and polysorbate 80/ γ -CD- C_{10} nanoreservoirs displayed improved pharmacokinetic profiles, compared to ART solution. Indeed, lower plasma clearance and longer half-life (3 and 5 hours, respectively) of ART were obtained with both formulations. These colloidal formulations of ART may provide a promising alternative for the treatment of severe malaria.

Keywords: Malaria, artemisinin, bioesterified cyclodextrins, polyethylene glycol, nanoparticles, biological evaluations.

Contact : Dr B. Gérard Josias YAMEOGO, josiasbyq@yahoo.fr