



Université Claude Bernard



Lyon 1

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **23 février 2018**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Brenda ARMENDARIZ-BARRAGAN**

Titre de la thèse : « Nanomedicines à base de produits naturels pour le traitement de la tuberculose »



Résumé

Actuellement, la tuberculose (TB) est la deuxième maladie infectieuse au monde avec une forte prévalence et un taux de mortalité annuel élevé. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a récemment dévoilé sa nouvelle stratégie, appelée «Mettre fin à la tuberculose», pour la prévention, le contrôle et l'éradication de cette maladie. Les résultats doivent mener à une éradication totale d'ici au 2035. Dans le cadre des objectifs spécifiques de cette stratégie, l'OMS a intégré la recherche de nouvelles connaissances et innovations scientifiques qui améliorent et augmentent l'efficacité des traitements qui sont utilisés contre cette maladie.

Deux des stratégies pharmaceutiques qui ont été les plus étudiées pendant ces dernières années ayant comme objectif principal d'augmenter l'efficacité globale des régimes thérapeutiques utilisés dans la tuberculose comprennent: i) l'incorporation de médicaments antituberculeux de première et de seconde ligne dans des systèmes de libération contrôlé, en particulier les nanoparticules polymères (NP); et, ii) l'utilisation de produits naturels (par exemple, des extraits de plantes ou des composés isolés) comme adjuvants, c'est-à-dire des substances qui, lorsqu'elles sont administrées conjointement avec des médicaments existants, augmentent leur activité.

Dans ce contexte, ce travail de recherche a conduit au développement de deux stratégies pour rendre le traitement de la tuberculose plus efficace. D'une part, on a proposé le développement d'une nanomédecine à base de NP biodégradables contenant un principe actif antituberculeux de deuxième ligne, la clofazimine (CFM). D'autre part, on a conçu le développement des systèmes adjuvants provenant d'extraits végétaux obtenus à partir de

l'arbre *Schinus molle*, lesquels ont été aussi incorporés dans des NP (biodégradables et non biodégradables). Dans cette deuxième stratégie, l'objectif principal a été l'obtention de potentielles nanoformulations qui permettent une application sûre de ces extraits par diverses voies d'administration (p. ex. par voie intraveineuse, pulmonaire ou orale).

Dans ce travail, le Chapitre I est une revue de la littérature sur l'étude des produits naturels (spécifiquement des extraits de plantes) qui ont été proposés comme des agents potentiellement antibactériens contre *Mycobacterium tuberculosis*. En particulier, le Tableau I.1 montre différentes études d'extraits de plantes qui ont été évaluées en fonction de leur potentiel pour inhiber la croissance des différentes souches de *M. tuberculosis*, ainsi, les extraits de plantes sont devenus une source potentielle de traitements contre la tuberculose. Considérant les différents résultats obtenus jusqu'à présent, les extraits d'*Actiniopteris radiata*, *Allium sativum*, *Aristolochia brevipes*, *Callophyllum brasiliense*, *Cassia fistula*, *Leucas marrubioides*, *Quercus infectoria* et *Syzygium aromaticum* ont présenté une concentration inhibitrice minimale (CMI) importante, inférieure à 25 µg / ml, contre des souches de *M. tuberculosis*. D'autre part, le Tableau I.2 montre les principaux composés isolés des plantes qui ont un potentiel antituberculeux relevant, avec une CMI inférieure à 10 µg / ml. Par exemple, la N-oxyde d'oridine (*Allium stipitatum*) et la bidebiline E (*Polyalthia cerasoides*) ont montré des activités contre la souche H37Rv. En plus, l'éthyl-p-méthoxycinnamate (*Kaempferia galanga*) a montré une CMI *in vitro* de 0.485 et 0.242 mM contre les souches H37Ra et H37Rv, respectivement. Cette activité antituberculeuse est similaire à celle-là montrée par des principes actifs antituberculeux utilisés dans des médicaments brevetés. D'autres composés, par exemple, la bisnordihydroxiférine (*Strychnos mitscherlichii*) et la 7α-acétoxy-6β-hydroxyleanone (*Plectranthus grandidentatus*), présentent une activité antituberculeuse significative contre les souches de *M. tuberculosis* résistants aux médicaments de premier choix. Globalement, les extraits de plantes et les composés isolés ouvrent une opportunité importante pour être appliqués dans des schémas thérapeutiques ou comme des adjuvants de médicaments existants pour augmenter l'efficacité de la lutte contre la tuberculose. Cependant, pour leur application chez l'homme, ces actifs doivent être formulés, ce qui représente certaines limitations et difficultés qui sont mentionnées tout au long de ce travail.

Le Chapitre II concerne une revue de la littérature sur la formulation des produits naturels, comme, des extraits de plantes, des huiles essentielles et des composés isolés dans des

systèmes particuliers pharmaceutiques dans le but de protéger, administrer, biodiriger et augmenter les activités biologiques que ces produits naturels présentent sous leur forme libre. Des formulations basées sur des nanoparticules lipidiques solides, des cyclodextrines et des nanoparticules polymériques, parmi d'autres, ont démontré d'importantes activités biologiques, par exemple, antioxydantes, antifongiques, antibactériennes, anticancéreuses, de conservation alimentaire et cosmétique dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Particulièrement, en raison de leurs propriétés physicochimiques, les NP sont choisis pour la formulation d'extraits de plantes, permettant une administration thérapeutique par différentes voies, ainsi qu'une augmentation de leur activité biologique. Par exemple, des extraits de *Polygala senega* et de *Garcinia mangostana*, avec une activité anticancéreuse potentielle, ont été encapsulés dans des NP montrant des résultats *in vitro* importants. Des formulations comme les précédentes permettent d'établir que l'incorporation des extraits de plantes aux NP pourrait augmenter leur potentiel thérapeutique et leur application par diverses voies (par exemple, orale, intraveineuse ou pulmonaire) dans des nouveaux schémas du traitement de la TB.

Le Chapitre III décrit le design et le développement d'une nanomédecine à partir de NP biodégradables et d'un principe actif de deuxième ligne, la clofazimine. C'est un principe actif hautement lipophile, ce qui limite son absorption et, par conséquent, son administration pendant des périodes prolongées, comme dans le cas des schémas thérapeutiques de la TB. Dans le but d'obtenir une nanomédecine permettant l'application intraveineuse et la libération prolongée de la clofazimine, des NP ont été élaborées à partir d'un polymère biodégradable, l'acide polylactique (PLA) et, ensuite, leur activité *in vitro* contre *M. tuberculosis* H37Rv a été évaluée. La nanoformulation contenant la clofazimine a donné une taille de particules de 170 ± 20 nm, une distribution de taille uniforme et un potentiel zêta de $-18,80 \pm 6,60$ mV. Pour la détermination de la quantité de principe actif encapsulé, une méthode de quantification par chromatographie liquide haute performance (CLHP) a été développée et validée. Cette méthode a permis d'établir un pourcentage d'encapsulation de $2,05 \pm 0,20$ et une efficacité d'encapsulation de $62,50 \pm 2,16\%$. Dans l'analyse du profil thermique par calorimétrie différentielle à balayage (CDB), au cas des NP chargées, l'absence d'un endotherme caractéristique pour le point de fusion de la clofazimine nous a fait supposer que ces molécules sont probablement dans un état amorphe dans le NP, immergé dans le réseau complexe du polymère avec un accommodement aléatoire dans le système. De son côté, l'analyse par spectroscopie infrarouge (FT-IR) de la formulation a suggéré qu'il n'y a pas de formation de

nouveaux composés à partir des composants du NP, ce qui indique qu'il n'y a qu'une interaction chimique entre les composés formant le système. L'évaluation de la libération *in vitro* du principe actif réalisée pendant 28h, a montré une libération de 50% jusqu'à 5h. Par la suite, une libération finale de 73% de la clofazimine a été obtenue à partir des NP (5 à 28h). Concernant l'évaluation *in vitro* de la nanomédecine contre *M. tuberculosis*, il a été montré que l'encapsulation de la clofazimine augmente son activité antituberculeuse en enregistrant une diminution de la CMI à 123 ng/ml en comparaison à celle du médicament libre (136 ng/ml). Enfin, lorsque les NP-clofazimine ont été lyophilisées pour leur conservation, elles ont retrouvé leur taille d'origine et ont montré une grande stabilité au stockage pendant 2 ans. Finalement, à partir des résultats de cette étape de la thèse, il est possible d'affirmer que la nanomédecine élaborée à base de PLA et de la clofazimine a potentiellement un grand intérêt pour être utilisée dans le traitement de la TB.

Le Chapitre IV traite sur le design et le développement de trois formulations des NP (biodégradables et non biodégradables) contenant l'extrait méthanolique de la feuille de *Schinus molle*, lesquelles pourraient être utilisées comme des adjuvants dans le traitement de la tuberculose. Des études faites ultérieurement ont montré que des extraits de *S. molle* avaient une activité potentielle contre *M. tuberculosis* H37Rv ; cependant, en raison du mélange complexe des molécules contenues dans un extrait végétal et de la présence du solvant organique, son dosage et son application *in vivo* et *in vitro* est considérablement difficile. Afin de développer des formulations permettant l'application orale, intraveineuse ou pulmonaire de l'extrait méthanolique de feuilles de *S. molle*, des formulations à base de deux polymères biodégradables (PLA et l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA)) et un polymère non biodégradable (Eudragit® L100-55) ont été conçues, élaborées et caractérisées. Les NP chargées d'extrait végétal présentaient une taille comprise entre 180 et 230 nm, une distribution de taille uniforme et un potentiel zêta légèrement négatif (entre -14 et -22 mV). Le profil chromatographique de l'extrait végétal brut et encapsulé a été obtenu par HPLC, permettant d'établir pour celui-ci des pourcentages d'encapsulation compris entre 33 et 45%, dans les trois nanoformulations. L'analyse morphologique par MEB a montré des NP avec une forme sphérique et a confirmé la taille et la distribution uniforme de taille déterminées précédemment. L'analyse par calorimétrie différentielle à balayage, a permis d'établir que dans la formulation de polymère biodégradable (PLGA), les composés de l'extrait ont été incorporés à l'état amorphe ou dispersés dans la matrice du polymère. Cependant, dans le cas de la

formulation des NP non biodégradables (EL100-55), les composés pourraient être dans un état cristallin dans le réseau polymère. L'analyse par spectroscopie infrarouge a aussi permis d'établir qu'il est possible que l'encapsulation de l'extrait soit sélective (seuls quelques composés ont été incorporés) dans chacune des formulations. Dans l'évaluation *in vitro* de l'activité antituberculeuse des nanoformulations, il a été déterminé que l'activité de l'extrait végétal encapsulé augmentait de 2 à 4 fois par rapport à celle de l'extrait libre, obtenant une CMI comprise entre 30 et 44 µg/ml. En général, la taille nanométrique des formulations pourrait favoriser l'internalisation et l'accumulation de l'extrait dans la mycobactérie. D'autre part, le profil de libération *in vitro* de l'extrait dans différentes formulations a montré un effet d'éclatement initial (0 à 3h) et une libération prolongée subséquente de l'extrait jusqu'à 28h du test. Enfin, les essais de toxicité *in vivo* avec le crustacé *Artemia salina* et *in vitro* avec les érythrocytes humains ont montré que l'encapsulation de l'extrait de *S. molle* dans des NP a permis de diminuer considérablement la toxicité du produit naturel en augmentant sa biocompatibilité avec les organismes (*A. salina*) ou les cellules humaines (érythrocytes). Ces résultats ont montré que ces nanoformulations permettent d'utiliser les extraits de *S. molle* par différentes voies et pourront être utilisés comme adjuvants dans le traitement de la TB.

Les conclusions du travail sont détaillées à la fin du manuscrit.