

Université de POITIERS
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2020

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement
le 3 mars 2020 à POITIERS
par Mademoiselle BAILLEUL Mélanie
10/11/1993

**La médecine traditionnelle, une alternative
aux traitements conventionnels contre le
paludisme ?**

Composition du jury :

Président : Monsieur François Seguin, Professeur

Membre : Madame Véronique Moreau, Docteur en pharmacie

Directrice de thèse : Madame Anne Wahl, Maître de conférences

Université de POITIERS
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2020

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement
le 3 mars 2020 à POITIERS
par Mademoiselle BAILLEUL Mélanie
10/11/1993

**La médecine traditionnelle, une alternative
aux traitements conventionnels contre le
paludisme ?**

Composition du jury :

Président : Monsieur François Seguin, Professeur

Membre : Madame Véronique Moreau, Docteur en pharmacie

Directrice de thèse : Madame Anne Wahl, Maître de conférences



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie (HDR)
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- CHAUZY Alexia, Pharmacologie, pharmacocinétique
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

AHU

- BINSON Guillaume

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- ELIOT Guillaume, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier
- GAY Julie

Poste de Doctorant

- FREYSSIN Aline

Remerciements

A Monsieur le Professeur François Seguin, qui me fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse. Je vous en remercie sincèrement.

A Madame Anne Wahl, ma directrice de thèse. Merci d'avoir accepté de me guider dans l'écriture de cette thèse et d'avoir été présente lorsque j'en avais besoin. Je vous remercie.

A Madame Véronique Moreau, Docteur en pharmacie, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Merci aussi pour toutes les connaissances j'ai pu acquérir à vos côtés au cours de mes études et pour la chance que vous m'avez donnée de m'épanouir dans votre officine maintenant que je suis diplômée. C'est un honneur.

Je souhaite remercier toute l'équipe de la Pharmacie des Deux Communes de Buxerolles, pour leur gentillesse et leur patience.

A mes parents, mes grands-parents et mon frère ainsi que tous ceux qui ont cru en moi, pour leur soutien tout au long de mes études.

Table des matières

| | | |
|------|--|----|
| I. | Le paludisme | 2 |
| 1. | Histoire du paludisme et des premiers traitements..... | 2 |
| a. | Le paludisme de l'Antiquité à la découverte du vecteur..... | 2 |
| b. | La quinine, le premier traitement contre le paludisme..... | 3 |
| c. | De la médecine traditionnelle à la découverte de l'artémisinine | 4 |
| 2. | Epidémiologie | 5 |
| 3. | Le vecteur | 6 |
| 4. | L'agent pathogène (<i>Plasmodium sp.</i>)..... | 7 |
| a. | La phase asexuée (schizogonie) :..... | 7 |
| b. | La phase sexuée (sporogonie)..... | 8 |
| 5. | Les différentes espèces de <i>Plasmodium</i> responsables du paludisme chez l'Homme..... | 9 |
| a. | <i>Plasmodium falciparum</i> | 9 |
| b. | <i>Plasmodium vivax</i> | 10 |
| c. | <i>Plasmodium ovale</i> | 11 |
| d. | <i>Plasmodium malariae</i> | 12 |
| e. | <i>Plasmodium knowlesi</i> | 13 |
| 6. | Diagnostic..... | 13 |
| II. | Chimioprophylaxie et traitements curatifs conventionnels contre le paludisme..... | 14 |
| 1. | Les chimioprophylaxies | 14 |
| a. | Principe | 14 |
| b. | Prescription d'une chimioprophylaxie..... | 15 |
| c. | Schéma de la prophylaxie | 15 |
| 2. | Les traitements curatifs | 16 |
| III. | Les résistances aux traitements anti-paludéens | 18 |
| 1. | Mécanisme d'action de la protéine K13 normale et conséquence des mutations | 18 |
| 2. | Mutations du gène pfK13 | 19 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3. | Mutations sur des gènes codant pour des transporteurs ABC | 24 |
| a. | Mutation de PfMDR-1 | 25 |
| b. | Mutation de PfCRT | 26 |
| IV. | L'artémisinine | 28 |
| 1. | Armoise annuelle (<i>Artemisia annua</i>) | 28 |
| a. | La plante..... | 28 |
| b. | Biosynthèse de l'artémisinine | 30 |
| c. | Mécanisme d'action | 31 |
| 2. | Evaluation des effets antipaludéens des tisanes d' <i>Artemisia</i> | 33 |
| V. | Des plantes pour de nouveaux traitements | 46 |
| 1. | Les plantes africaines utilisées en médecine traditionnelle contre le paludisme | 46 |
| 2. | Les plantes asiatiques utilisées en médecine traditionnelle contre le paludisme | 55 |

Avant-propos

Les plantes ont toujours été utilisées en médecine, sous forme entières ou non, sous forme de poudres, en décoction ou après extraction de molécules actives présentes dans ces plantes.

Dans le cas du paludisme, le premier traitement a été la quinine, provenant de l'écorce de quinquina. Utilisée de manière empirique dès le XVII^{ème} siècle sous forme de décoction de poudre d'écorce, la quinine a par la suite été administrée sous forme purifiée dans le but d'améliorer la qualité et le contrôle du traitement. L'apparition de résistances a nécessité la recherche de nouvelles molécules et a conduit à la découverte de l'artémisinine, issue d'*Artemisia annua*, une plante utilisée en médecine traditionnelle en Asie et en Afrique.

Actuellement, les traitements de première intention dans les infections graves à *P. falciparum*, les ACTs, sont composés de dérivés synthétisés chimiquement à partir de l'artémisinine, mais des résistances apparaissent d'ores et déjà en Asie du Sud Est.

L'histoire se répète, posant alors la question de savoir si les médecines traditionnelles pourraient être associées ou représenter une alternative aux traitements pharmaceutiques actuels.

Mettre en commun les connaissances et les pratiques de la médecine traditionnelle et de la médecine moderne présenterait plusieurs avantages, comme de permettre la découverte de nouvelles molécules et de modifier pour les thérapeutes, traditionnels ou non, les approches et la prise en charge de la pathologie, tout en augmentant les contrôles sur la sécurité et l'efficacité des thérapies traditionnelles.

Une telle collaboration supposerait donc de reconnaître la médecine traditionnelle et les tradithérapeutes comme des partenaires face aux difficultés posées par l'apparition des résistances aux traitements. L'impact s'évaluerait alors en termes de santé publique mais aussi économique, en permettant aux populations les plus pauvres d'accéder à des traitements fiables par des thérapeutes locaux.

I. Le paludisme

Le paludisme est une maladie infectieuse (protozoose) causée par un parasite du genre *Plasmodium* et transmise par les moustiques femelles du genre *Anopheles*. Selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le paludisme serait responsable de la mort de près de 500 000 personnes par an dans le monde et près de la moitié de la population mondiale serait à risque pour cette maladie infectieuse¹. Si des traitements existent, leur efficacité est limitée en raison de la capacité particulièrement élevée du parasite à modifier son génome et à acquérir un phénotype résistant aux drogues².

L'enjeu actuel de santé publique est donc de parvenir à isoler de nouvelles molécules afin de proposer des thérapies plus efficaces. Pour ce faire, une méthode consiste à se baser sur le savoir-faire ancestral des tradi-thérapeutes et leur connaissance de la flore locale, pour ensuite évaluer les potentialités anti-paludéennes des composés de ces plantes.

1. Histoire du paludisme et des premiers traitements

a. Le paludisme de l'Antiquité à la découverte du vecteur

Le paludisme, du latin *palus* qui signifie marécage, est une maladie parasitaire très ancienne également appelée malaria de "mal aria" (« mauvais air »), dont on retrouve la description dans de nombreux documents ou vestiges provenant des continents africain ou asiatique.

Le papyrus Ebers daté de 1570 ans avant Jésus-Christ (JC) et découvert à Louxor en 1862 décrit ainsi une pathologie associant fièvre et splénomégalie, splénomégalie que l'on a retrouvée dans certaines momies égyptiennes vieilles de plus de 5000 ans.

En Inde, deux ouvrages médicaux datant du XV^{ème} siècle avant JC, le Charaka Samhita et le Susruta Samhita, évoquent la théorie selon laquelle les fièvres pourraient être transmises par les moustiques. Dans les textes védiques, le paludisme est décrit comme une conséquence de la colère du Dieu Shiva. Dans la mythologie chinoise, quant à elle, le paludisme est représenté par trois démons, le premier portant un marteau, le second un seau d'eau froide et le troisième attisant un feu. Ces démons symbolisent respectivement les céphalées, la sueur et la fièvre, symptômes typiques de cette maladie.

En Europe, les médecins grecs Hippocrate (460 – 370 avant JC) et Galien (129 – 199 après JC), ou le romain Celsus (25 avant JC –54 après JC) ont décrit à leur tour des fièvres " tierces " ou " quartes " mortelles, contractées à la fin de l'été et à proximité de zones marécageuses³. La preuve scientifique directe de la présence du paludisme dans la Rome impériale a été apportée en 2016 par les travaux du Pr H. Poinar qui a recherché des traces du parasite dans l'ADN mitochondrial issu de la pulpe dentaire de 58 squelettes adultes. Les prélèvements ont été effectués dans la nécropole d'Isola Sacra (1^{er} au III^{ème} siècle après JC), proche de l'ancien port de Rome et dans les cimetières de Velia (1^{er} au II^{ème} siècle après JC), petite ville portuaire du sud-ouest de l'Italie et de Vagnari (1^{er} au IV^{ème} siècle après JC), cité rurale située à 350 km au sud-est de Rome. Les résultats obtenus ont mis en évidence la présence de *Plasmodium falciparum* chez deux individus, l'un de Velia, l'autre de Vagnari⁴.

La découverte du parasite responsable de la pathologie ne se fera qu'en 1880, par le médecin militaire français Alphonse Laveran qui recevra pour ses travaux le prix Nobel de médecine en 1907⁵ (Figure 1). En 1895 le britannique Ronald Ross, médecin bactériologiste dans l'armée des Indes, découvre que l'anophèle est le vecteur du paludisme chez les oiseaux. Il obtiendra pour ces travaux le prix Nobel de médecine en 1902³ (Figure 1).

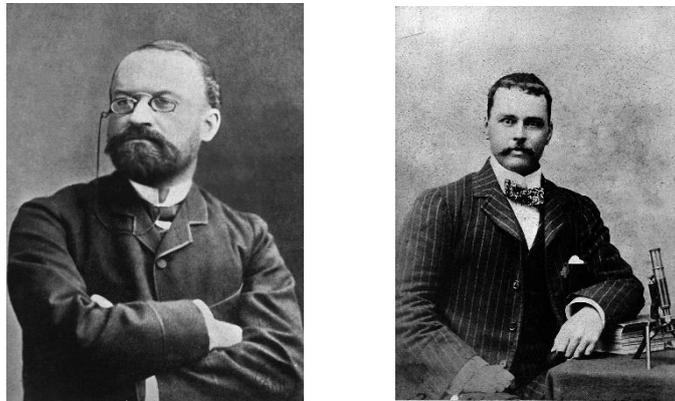


Figure 1 : Charles-Louis-Alphonse Laveran et Ronald Ross
(nlm.nih.gov Wikimedia commons et wellcomecollection.org)

b. La quinine, le premier traitement contre le paludisme

Il faudra attendre le XVII^{ème} siècle pour voir apparaître un premier traitement, la quinine. C'est Juan Lopez, un jésuite installé au Pérou, qui, s'inspirant de la médecine traditionnelle des indiens, aurait le premier préparé et utilisé de la poudre d'écorce de quinquina en décoction pour soigner des fièvres intermittentes. La poudre brute produite à partir de l'écorce de quinquina est longtemps restée la seule proposition thérapeutique. Elle est riche en composés phénoliques, acides organiques (acide quinique), saponosides à génine triterpénique

dicarboxylique, et l'effet thérapeutique obtenu à l'époque s'explique aujourd'hui par le fait que la quinine, en particulier, est active sur le cycle intra-érythrocytaire du parasite (Cf. § I.4.a).

On rapporte qu'en France, une épidémie de paludisme a sévi au début du XIX^{ème} siècle au moment de la construction du canal Saint Martin. La poudre d'écorce de quinquina a alors été largement utilisée pour traiter ces nombreux cas³. En 1820, Pelletier et Caventou deux pharmaciens français transforment et purifient la poudre d'écorce de quinquina de manière à produire un médicament qui conserve les effets thérapeutiques mais remédie aux effets aléatoires de l'utilisation de la poudre brute.

Au cours de la seconde guerre mondiale, la quinine et les premiers antipaludéens de synthèse, dont la chloroquine, auront une place de choix pour traiter les malades atteints du paludisme.

c. De la médecine traditionnelle à la découverte de l'artémisinine

Deux siècles avant notre ère, la pharmacopée traditionnelle chinoise préconisait l'utilisation d'extraits de Qinghao (*Artemisia annua*) pour traiter les fièvres⁶.

Mais c'est pendant la guerre du Vietnam (1955-1975) qu'ont pu être mis en évidence scientifiquement les effets anti-paludéens de l'artémisinine. Pendant cette période, les soldats - américains comme vietnamiens- traités par chloroquine mourraient du paludisme en raison de la survenue de résistances. L'industrie pharmaceutique américaine se lance alors dans la recherche et la mise au point de nouveaux traitements conduisant au développement de la méfloquine ou l'halofantrine. Si certaines de ces molécules sont toujours utilisées aujourd'hui, d'autres ont entraîné de nouvelles résistances avant même leur mise sur le marché. Nous verrons cependant que ces molécules restent utilisées dans certains protocoles thérapeutiques.

De son côté, le 23 mai 1967, Mao Tse Dong organise une première réunion à Pékin dans le but de trouver de nouveaux traitements pour faire face aux résistances. Le projet 523 (pour 23 Mai) regroupe 500 scientifiques, médecins, phytochimistes et pharmacologues sous la direction du Dr Youyou Tu qui recevra pour ces travaux le prix Nobel de médecine en 2015. Pendant 14 ans, après avoir mené des enquêtes ethnopharmacologiques auprès de tradi-thérapeutes, ils vont cribler plus de 40 000 produits de synthèse et substances issues de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle chinoise. 2000 préparations traditionnelles seront répertoriées et 10% d'entre elles ainsi que 380 extraits de plantes seront testés *in vivo* sur des modèles murins. Les recherches n'ont pas été probantes jusqu'à l'analyse d'un extrait de Qinghao, nom chinois d'*Artemisia annua*. Devant les difficultés rencontrées pour obtenir des résultats reproductibles, l'équipe s'inspire d'un manuscrit datant de la Dynastie Jin écrit par Ge Hong (284-346) intitulé

« Des formules d'urgence à garder à portée de main ». Dans cet ouvrage, est décrite la manière de préparer un extrait de Qinghao : « infuser une poignée de Qinghao dans 2 litres d'eau, essorer la plante et boire le liquide dans sa totalité ». Cette découverte amène Youyou Tu à modifier sa méthode d'extraction par ébullition, probablement responsable de la destruction d'une partie des principes actifs de la plante, et à s'orienter vers une extraction à plus basse température. Ce n'est que le 4 octobre 1971, soit quatre ans après le début du projet, qu'un extrait non toxique est isolé. Il présente une efficacité de 100% dans le modèle murin déjà utilisé mais également chez un singe infecté par *Plasmodium cynomolgi*. Après s'être assurés de l'innocuité de l'extrait en le testant sur eux-mêmes et sur la foi des documents historiques, les scientifiques décident de réaliser des essais sur 21 patients atteints de paludisme. Ils sélectionnent des patients vivant dans la province du Hainan, où sévit une forme de paludisme à *Plasmodium falciparum* résistant à la chloroquine. Chez les patients traités par l'extrait de Qinghao, on observe une élimination fulgurante du parasite contrairement au groupe témoin traité par chloroquine⁷.

Par la suite, l'artémisinine est purifiée puis de nombreux dérivés sont synthétisés. Ces molécules restent aujourd'hui les plus utilisées dans le traitement du paludisme.

2. Epidémiologie

Le paludisme constitue la première endémie parasitaire mondiale, avec de graves effets chez les sujets fragiles tels que les enfants ou les femmes enceintes. En 2017, l'OMS estimait l'incidence à 219 millions de cas et la mortalité à 455 000 décès. Ces chiffres sont légèrement en baisse par rapport à 2010 où l'on estimait l'incidence à 239 millions et la mortalité à 607 000 décès dans le monde¹. On estime à 40% la population mondiale y étant exposée et à 91 le nombre de pays à risque. La répartition des cas en fonction de la gravité ou du nombre n'est pas uniforme dans le monde. Ainsi, la majorité des cas (90%) est issue des zones tropicales d'Afrique, mais on retrouve aussi ce parasite en Asie et en Amérique latine (Figure 2, page 6). En France métropolitaine, les cas de paludisme sont presque toujours observés chez des personnes de retour de zones endémiques⁸⁻¹⁰. Cette maladie doit être déclarée systématiquement aux autorités de santé.

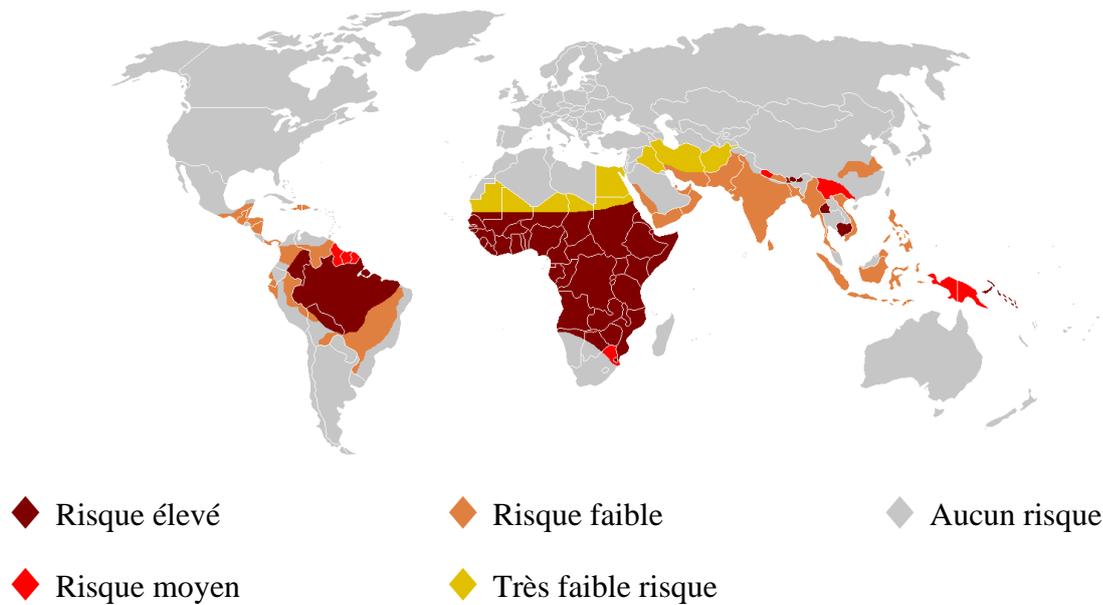


Figure 2 : Risque statistique de contamination à Plasmodium falciparum au cours d'un séjour de moins d'un mois, CHU de Rouen (Wikimedia Commons)

3. Le vecteur

Ce sont donc les travaux de Ronald Ross en 1895 qui permettent de définir l'anophèle comme le vecteur de la pathologie. L'anophèle est un insecte de la famille des *Culicidae* et du genre *Anopheles* (Figure 3). Seule la femelle, qui est hématophage, peut transmettre le parasite. Son activité est vespérale, elle débute au coucher du soleil et est prépondérante entre 23h et 6h du matin. Sa durée de vie à l'âge adulte est d'environ 2 mois ⁹. La transmission s'effectue lors d'un repas sanguin indispensable au développement de ses œufs.



Figure 3 : Anopheles stephensi au cours d'un repas de sang d'un hôte humain (Bibliothèque d'image de santé publique-Wikimedia Commons)

4. L'agent pathogène (*Plasmodium sp.*)

Le parasite responsable du paludisme est un protozoaire faisant partie de l'embranchement des *Apicomplexa*. Son développement se réalise selon un cycle hétéroxène, c'est-à-dire que la phase sexuée, ou sporogonie, se déroule chez l'anophèle femelle et la phase asexuée, ou schizogonie, se déroule chez un hôte vertébré (Figure 4, page 8). Chez l'hôte, le cycle est divisé en deux phases, le cycle exo-érythrocytaire qui a lieu dans le foie et le cycle érythrocytaire qui a lieu dans les érythrocytes^{9,11}.

a. La phase asexuée (schizogonie) :

Le cycle exo-érythrocytaire :

La femelle anophèle pique son hôte au niveau d'un capillaire et injecte sa salive contenant des sporozoïtes. Ces sporozoïtes migrent jusqu'au foie où ils infectent les hépatocytes. Dans les cellules hépatiques, il y a formation de schizontes (formes multinucléées) qui après quelques jours de maturation vont finir par se rompre libérant des mérozoïtes dans la circulation sanguine (Figure 4, page 8).

Chez *P. ovale* et *P. vivax*, la schizogonie peut être retardée par la transformation des sporozoïtes en hypnozoïtes (phase de latence) expliquant chez ces deux espèces des reviviscences tardives. Cette phase hypnozoïte n'est pas observée chez les autres espèces¹¹.

Le cycle érythrocytaire :

Les mérozoïtes infectent les érythrocytes donnant des trophozoïtes immatures en forme d'anneaux. Ces trophozoïtes vont ensuite mûrir, former de nouveaux schizontes qui vont à nouveau se rompre en détruisant les globules rouges et en infestant de nouveaux érythrocytes. Cette partie du cycle est responsable des symptômes cliniques du paludisme. Tous les schizontes érythrocytaires se synchronisent et arrivent à maturité au même moment. Leur rupture simultanée est responsable des pics fébriles ; d'une fièvre tierce correspondant à des cycles de 48 heures ou d'une fièvre quarte correspondant à des cycles de 72 heures. Après plusieurs cycles certains schizontes vont devenir des gamétocytes qui pourront être ingérés lors d'un prochain repas sanguin¹¹ (Figure 4, page 8).

b. La phase sexuée (sporogonie)

Les gamétocytes sont ingérés par l'anophèle femelle lors d'un repas sanguin chez un hôte infecté et évoluent en gamètes mâles et femelles. Ces gamètes vont alors fusionner formant un œuf nommé ookynète. L'ookynète se fixe à la paroi externe de l'estomac du vecteur et devient un oocyste. Dans cet oocyste vont se développer des sporozoïtes et lors de la rupture de l'oocyste, les sporozoïtes vont migrer vers les glandes salivaires de la femelle anophèle. Ils sont alors prêts pour être transmis à un hôte vertébré au cours d'un futur repas sanguin¹¹.

La phase de sporogonie varie en fonction des espèces et des conditions climatiques entre 10 et 20 jours.

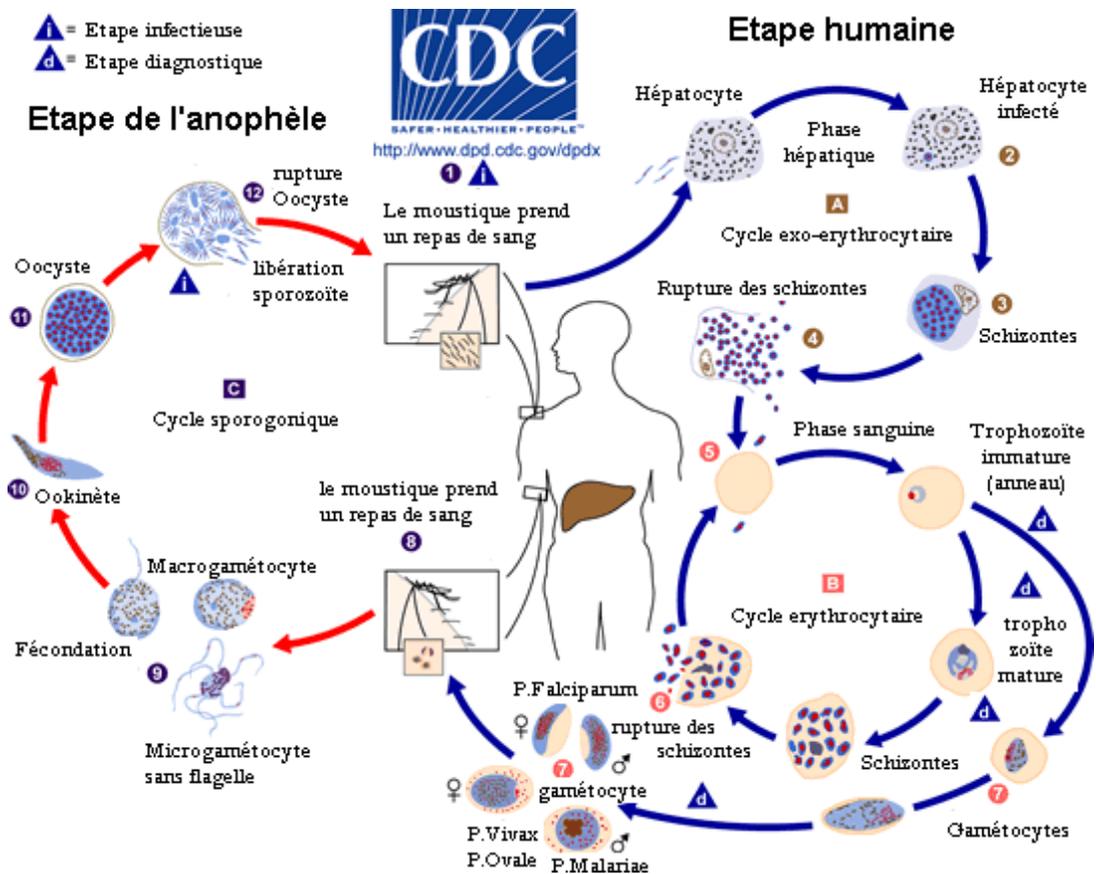


Figure 4 : Cycle de reproduction de Plasmodium (dpd.cdc.gov Wikimedia Commons)

5. Les différentes espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme chez l'Homme

Chez l'homme, cinq espèces de *Plasmodium* sont à l'origine du paludisme.

a. *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum est l'espèce la plus largement répandue dans le monde et à l'origine de la majorité des décès (Figure 5).

C'est également l'espèce qui présente l'incubation la plus courte, variant de 7 à 12 jours, ce qui permet lors des interrogatoires des patients d'orienter le diagnostic¹².

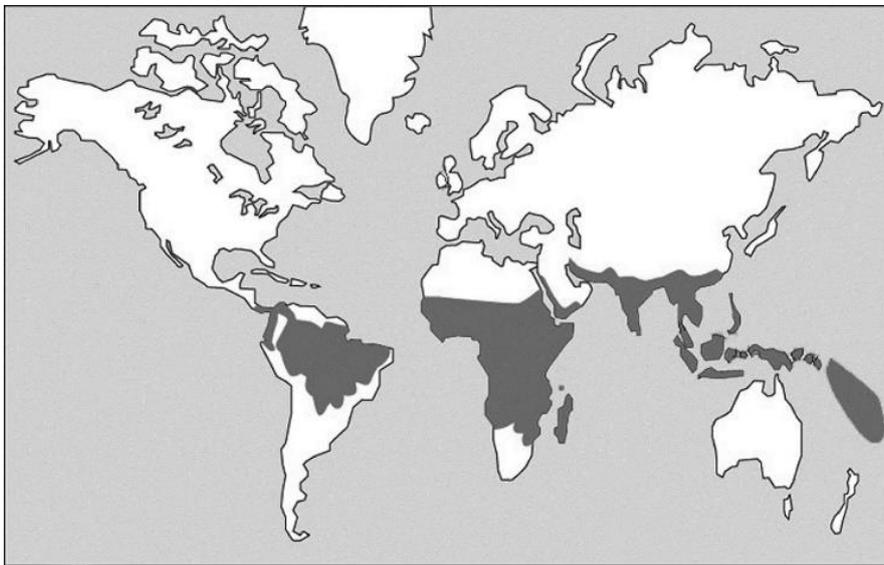


Figure 5 : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium falciparum (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL)

Dans les régions équatoriales, sa transmission a lieu tout au long de l'année avec des pics saisonniers alors que dans les zones tropicales, il est principalement transmis au cours des périodes chaudes et humides. La transmission ne se fait pas lorsque les températures sont inférieures à 18°C (Figure 6, page 10)¹².

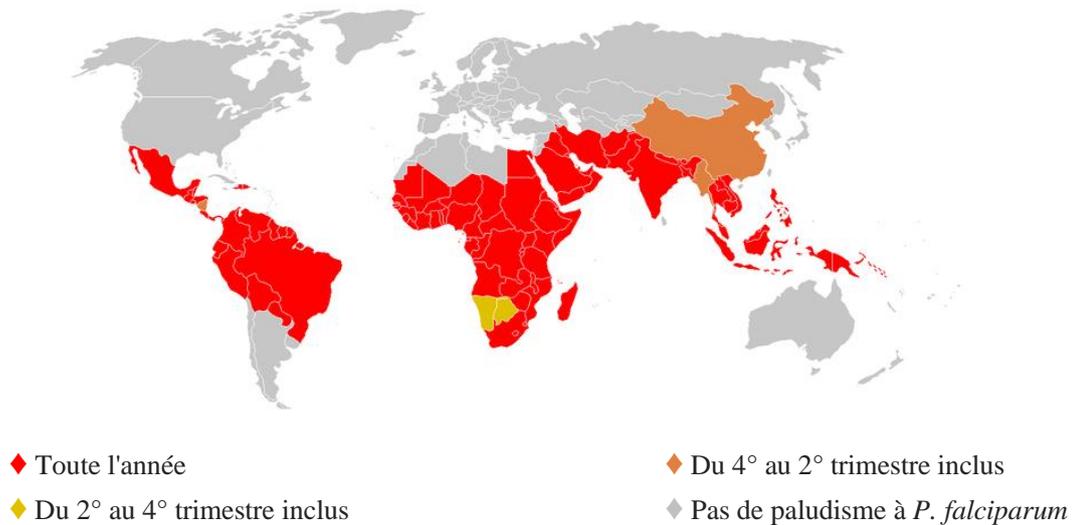


Figure 6 : Transmission du paludisme à P. falciparum en fonction de la période de l'année, CHU Rouen- (Wikimedia Commons)

Sur le plan clinique, lors d'une infection par *P. falciparum*, toutes les 48 heures environ survient la rupture des schizontes entraînant les pics de fièvre. L'accès pernicieux (ou accès palustre) apparaît généralement dans les 2 mois suivant le retour de zone endémique et dans un maximum d'un an après le retour. C'est pour cela que toute fièvre survenant dans l'année suivant le retour d'une zone d'endémie doit orienter vers un paludisme.

Cette forme de *Plasmodium* est responsable des formes cliniques graves et notamment du neuro-paludisme. Ictère et splénomégalie sont souvent associés à la fièvre cyclique.

b. *Plasmodium vivax*

Cette espèce sévit principalement en Amérique du Sud et en Asie (Figure 7, page 11). La période d'incubation de *P. vivax* varie de 7 à 15 jours avec des reviviscences possibles au cours des 4 années suivant l'infection¹².



Figure 7 : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium vivax (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL)

La transmission par l'anophèle ne peut avoir lieu en général qu'à partir de 15°C¹². Une infection par *P. vivax* cause chez l'Homme des symptômes bénins caractérisés par une fièvre tierce correspondant à un cycle de 48h.

Dans certaines régions, des patients possèdent un groupe sanguin Duffy négatif, correspondant à des érythrocytes ne présentant pas les récepteurs membranaires nécessaires à l'infection à *P. vivax*, par conséquent, ces patients ne peuvent déclencher un paludisme à *P. vivax*.

c. *Plasmodium ovale*

P. ovale est retrouvé principalement en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest (Figure 8, page 12).

L'incubation lors d'une infection par *P. ovale* est de 15 jours au minimum et des cas de reviviscence peuvent apparaître dans les 5 ans suivant l'infection.

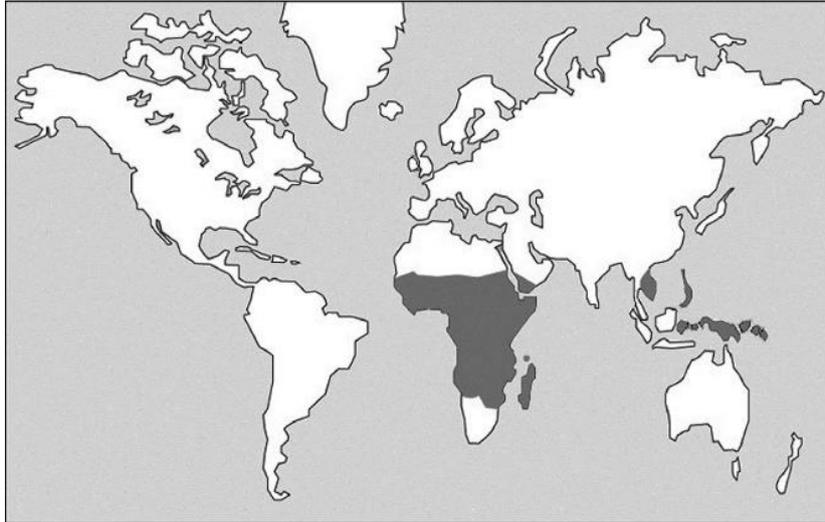


Figure 8 : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium ovale (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL)

P. ovale entraîne lui aussi une fièvre tierce bénigne (cycles de 48h). On considère qu'il remplace *P. vivax* là où ce dernier ne sévit pas.

d. *Plasmodium malariae*

P. malariae est principalement endémique de l'Amérique du Sud et de l'Asie (Figure 9). L'incubation dure entre 15 et 21 jours et des cas de reviviscence peuvent apparaître jusqu'à 20 ans après le retour de zone endémique.

Il est responsable de la fièvre quarte correspondant à des cycles de 72 heures.

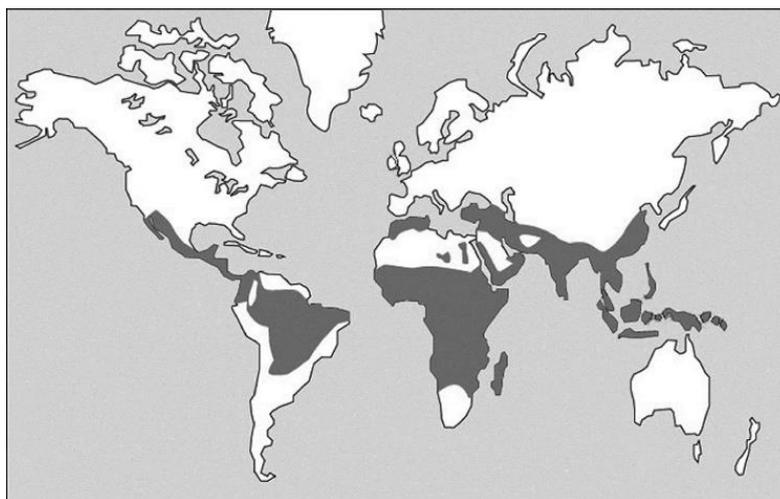


Figure 9 : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium malariae (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL)

e. *Plasmodium knowlesi*

P. knowlesi est une espèce de *Plasmodium* présente en Asie du Sud Est, en zone forestière et majoritairement en Malaisie, aux Philippines, à Singapour... et qui infeste les macaques (Figure 10). Quelques cas de zoonoses ont été décrits depuis 2004 et 15 décès ont été recensés depuis 2008¹³. Le cycle érythrocytaire de *P. knowlesi* s'effectue en 24 heures à la différence de ceux des autres *Plasmodium* retrouvés chez l'Homme. La fièvre est quotidienne.



Figure 10. : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium knowlesi (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL)

6. Diagnostic

En cas de suspicion d'infection par *Plasmodium*, le diagnostic doit être posé rapidement. La mise en évidence du parasite se fait par frottis sanguin à partir d'une goutte épaisse réalisée en dehors du pic fébrile, c'est le test diagnostic de référence¹⁴ (Figure 11, page 14). Il permet de déterminer si le patient est effectivement infecté par le parasite et, dans le cas où le diagnostic est positif, il permet de connaître l'espèce infestante et d'estimer la parasitémie, c'est-à-dire la concentration du parasite dans le sang. Les résultats doivent être rendus dans un délai maximum de deux heures.



Figure 11 : Plasmodium falciparum au stade anneau dans un frottis sanguin ; Dr. Greene, USCDCP

II. Chimio prophylaxie et traitements curatifs conventionnels contre le paludisme

1. Les chimio prophylaxies

a. Principe

La protection contre le paludisme s'effectue à deux niveaux. D'une part, une protection contre la piqûre d'anophèle par des barrières chimiques (répulsifs) et mécaniques (moustiquaires, vêtements longs en coton...) et d'autre part, une chimio prophylaxie dans les zones à fort risque d'infection. Ces précautions ne garantissent cependant pas une protection totale.

La chimio prophylaxie a pour objectif premier de prévenir les infections à *Plasmodium falciparum* puisqu'il s'agit de l'espèce la plus répandue au monde et qui cause la majorité des cas graves et des décès .

Les molécules utilisées en chimio prophylaxie actuellement ne préviennent pas en totalité les accès primaires et les formes de reviviscence de *Plasmodium vivax* et *ovale*. Pour *P. vivax* et *ovale*, il existe une seule molécule efficace contre la forme latente (hypnozoïtes), il s'agit de la primaquine. Cette molécule peut être prescrite dès le premier accès palustre après demande d'autorisation à l'ANSM puisque cette molécule possède une autorisation temporaire d'utilisation nominative (ATU nominative)¹⁵.

La méfloquine et la chloroquine ont un effet très limité contre *P. knowlesi* et par conséquent, une chimio prophylaxie lors d'un séjour dans des zones à risque de ce parasite doit tenir compte

du rapport bénéfice/risque et le voyageur doit en être informé de manière éclairée en raison d'effets secondaires éventuels.

b. Prescription d'une chimioprophylaxie

Une chimioprophylaxie n'est pas systématiquement prescrite. Il est nécessaire d'évaluer le rapport bénéfice/risque de l'utilisation de celle-ci en fonction de la zone de voyage, des conditions de vie sur place, du voyageur lui-même (femme enceinte, enfant, patient immunodéprimé...).

La zone de voyage

Dans la zone intertropicale de l'Asie ou de l'Amérique, la transmission du paludisme n'est pas homogène. Seules certaines zones sont à risque, généralement éloignées des zones touristiques et l'espèce majoritairement impliquée est *P. vivax*. De ce fait, un rapport précis des lieux qui seront visités est nécessaire. De plus, il est important de connaître l'environnement dans lequel dort le voyageur. Si celui-ci dort en milieu urbain, le risque est moindre que s'il dort en milieu rural¹⁵.

La saison

De plus, il faut prendre en compte la période à laquelle voyage le sujet. Comme indiqué précédemment (Cf.§ I.5), le risque de contamination est plus élevé au cours de la saison des pluies.

L'altitude

Au-delà de 1 500 mètres d'altitude en Afrique et de 2 500 mètres d'altitude en Amérique ou en Asie, le risque de transmission est proche de zéro puisque l'atmosphère n'est pas adaptée à la vie de l'anophèle¹⁵.

La durée du séjour

La majorité des infections à *Plasmodium* a lieu lors de séjours supérieurs à un mois¹⁵.

c. Schéma de la prophylaxie

Les antipaludéens ne sont délivrés que sur présentation d'une ordonnance et ne sont pas pris en charge par la sécurité sociale.

Le choix du traitement prophylactique se fait en fonction d'autres critères. Il faut tout d'abord tenir compte de l'âge et du poids du voyageur, car certains traitements prophylactiques peuvent être contre-indiqués pour de faibles poids ou des âges extrêmes. L'état de santé du patient est

aussi un critère majeur, il est par exemple indispensable de s'assurer que le patient ne prend aucun traitement pouvant créer des interactions avec les antipaludéens.

La majorité des cas de paludisme chez les patients ayant suivi un traitement prophylactique, relève d'une mauvaise observance de celui-ci¹⁶.

Pour prévenir un paludisme à *Plasmodium falciparum*, les traitements recommandés sont les suivants :

- Atovaquone-Proguanil (Malarone®)
- Doxycycline (Doxypalu®)
- Méfloquine (Lariam®) : molécule souvent moins bien tolérée chez l'adulte que chez l'enfant entraînant des effets secondaires nombreux et potentiellement graves.

Ces trois traitements ont une activité équivalente, le choix va dépendre de la tolérance du voyageur, de ses ressources financières et de la simplicité d'administration.

L'association chloroquine-proguanil n'est utilisée que s'il existe des contre-indications aux 3 traitements précédents, et en cas de voyage en Afrique subsaharienne uniquement. Le voyageur doit être informé d'une efficacité limitée de cette association¹⁵.

La chloroquine seule est prescrite en cas de voyage en Amérique tropicale, Caraïbes où il n'existe pas de résistance à cette molécule¹⁵.

Tous ces traitements prophylactiques agissent sur la phase érythrocytaire du cycle parasitaire et doivent donc être poursuivis plusieurs semaines après le retour de zone endémique, sauf la Malarone® qui a une action sur la phase hépatique et qui nécessite une poursuite de traitement sur une plus courte durée après le retour.¹⁴

2. Les traitements curatifs

Un traitement d'urgence ou traitement dit « de réserve » peut être prescrit au voyageur. Il s'agit d'un traitement à prendre au cours du séjour, sans avis médical et de manière exceptionnelle, si aucune prise en charge médicale n'est possible dans les 12 heures suivant l'apparition d'une fièvre¹⁵. La molécule utilisée doit être différente des traitements chimio-prophylactiques en cours. Généralement, les molécules utilisées sont des dérivés de l'artémisinine (artésunate ou artéméther, Figure 25, page 31).

Si le voyage est effectué avec un enfant, il est nécessaire de s'assurer qu'une consultation médicale est possible dans les 12 heures. Dans de très rares cas, on prescrit chez l'enfant ce traitement de réserve.

Dans le cas d'un diagnostic d'accès palustre grave, le traitement de référence est l'artésunate (dérivé de l'artémisinine) en intra-veineuse ou éventuellement la quinine en intra-veineuse si l'artésunate n'est pas immédiatement disponible. En première intention on utilisera un traitement associant l'artéméther et la luméfántrine et en seconde intention l'association atovaquone-proguanil (Figure 12)¹⁴.

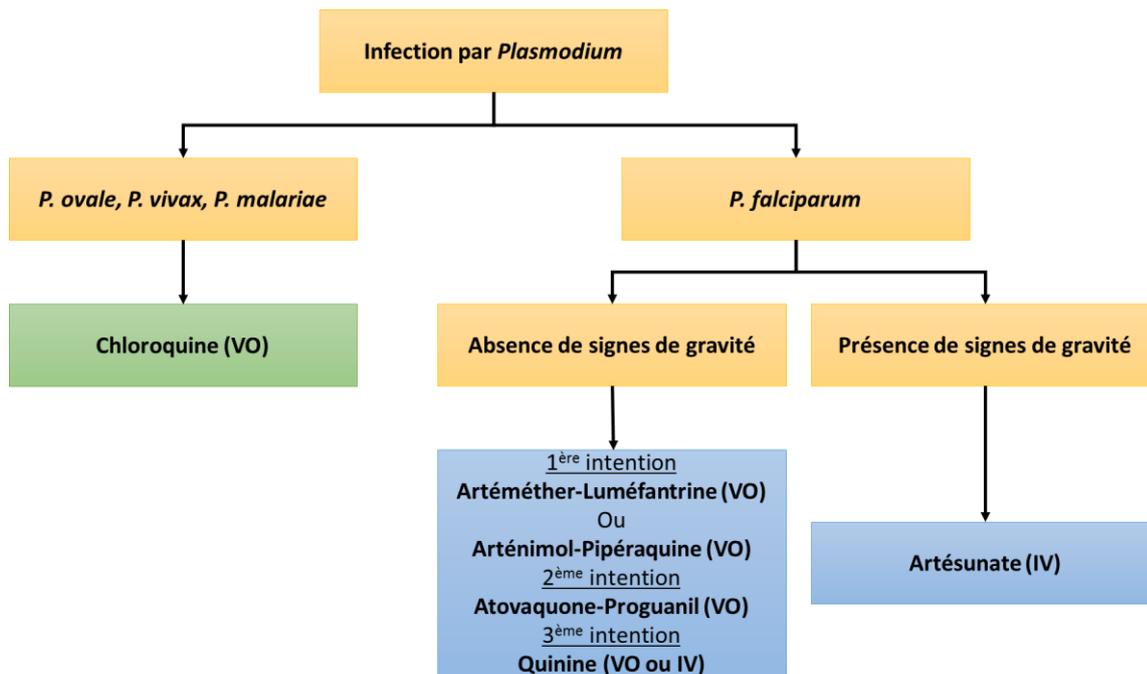


Figure 12 : Schéma décisionnel du traitement d'une infection par *Plasmodium falciparum* (Selon le Vidal.fr)
VO = Voie orale ; IV = Voie intraveineuse

Depuis 1994, on utilise l'artémisinine en association (ACTs : Artemisinin Combination Therapies) pour limiter les résistances cliniques après l'instauration du traitement par monothérapie.

De nos jours, cinq ACTs sont utilisés. Il s'agit des associations suivantes : Arthéméther + Luméfántrine ; Artésunate + Amodiaquine ; Artésunate + Méfloquine ; Artésunate + Sulfadoxine-pyriméthamine ainsi que Dihydroartémisinine + Pipéraqúine¹⁷.

Ces associations ont aussi un objectif pharmacologique, en effet, l'artémisinine et ses dérivés ont une action très rapide sur le parasite. La demi-vie plasmatique de l'artémisinine est de l'ordre d'une à deux heures alors que celle des autres antipaludéens varie de quelques jours à plusieurs semaines¹⁷. Pour éviter les échecs thérapeutiques et limiter les résistances, il est donc

nécessaire d'associer l'artémisinine ou ses dérivés avec une molécule dont le mode d'action est différent et possédant une demi-vie plus longue.

III. Les résistances aux traitements anti-paludéens

Les premières résistances à la chloroquine apparaissent dans les années 50 en Asie et ont été mises en évidence au cours de la guerre du Vietnam. Elles sont également apparues en Afrique au cours des trois décennies suivantes. Des résistances à l'association sulfadoxine-pyriméthamine sont ensuite survenues dans certaines zones d'endémies puis, plus récemment ont été rapportées des résistances à la méfloquine dans la péninsule indochinoise et en Amazonie¹⁸.

La résistance de *Plasmodium* à l'artémisinine ou ses dérivés est définie par une clairance parasitaire^a retardée, c'est-à-dire une élimination plus lente du parasite, à la suite d'un traitement par l'artémisinine que ce soit en monothérapie ou en thérapie combinée. Des études moléculaires ont été menées afin de caractériser les mécanismes d'acquisition de ces résistances. Elles ont permis de mettre en évidence trois gènes principaux chez le parasite :

(i) Le gène *pfk13* localisé sur le chromosome 15 code pour la protéine Kelch13 qui présente des domaines conservés BTB et Kelch-repeat-propeller généralement associés à une activité E3-ubiquitin-ligase¹⁹. Cette protéine est impliquée dans la régulation de la voie PI3Kinase (PI3K).

(ii) Les gènes *pfCRT* et *pfMDR1* qui eux codent pour des transporteurs ABC.

Ces trois gènes, lorsqu'ils sont mutés, diminuent la réponse aux traitements comme nous allons le détailler dans les paragraphes suivants.

1. Mécanisme d'action de la protéine K13 normale et conséquence des mutations

La protéine Kelch13 est indispensable à la croissance de *Plasmodium falciparum* au cours de la phase intra-érythrocytaire du parasite. Son rôle principal est de réguler la voie de signalisation PI3Kinase. Dans les cellules, la protéine PI3K induit la phosphorylation du phosphatidylinositol (PI) et active des cascades de phosphorylation conduisant à la croissance

^a Clairance parasitaire : taux de déclin du parasite chez son hôte

et à la survie cellulaire. Par ailleurs, en se liant à PI3K, Kelch13 régule négativement le taux de PI3K intracellulaire en induisant sa dégradation par ubiquitination (U)²⁰ (Figure 13).

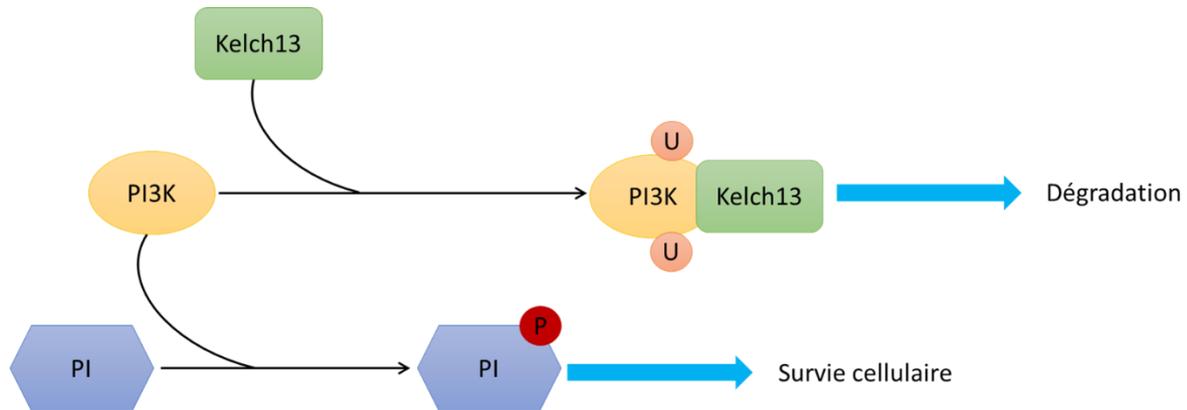


Figure 13 : Régulation de la croissance et de la survie cellulaire par la voie PI3K (d'après Burrows, 2015)

La protéine PI3K, en phosphorylant le phosphatidylinositol (PI), active la survie cellulaire. La protéine Kelch13, par son activité E3-ubiquitin-ligase, régule négativement le taux de PI3K cellulaire en induisant sa dégradation

La survenue d'une mutation sur le gène pfK13 empêche la protéine Kelch13 d'interagir avec PI3K. PI3K s'accumule donc dans la cellule et active constitutivement la voie de survie cellulaire, générant donc une résistance au traitement (Figure 14)²⁰.

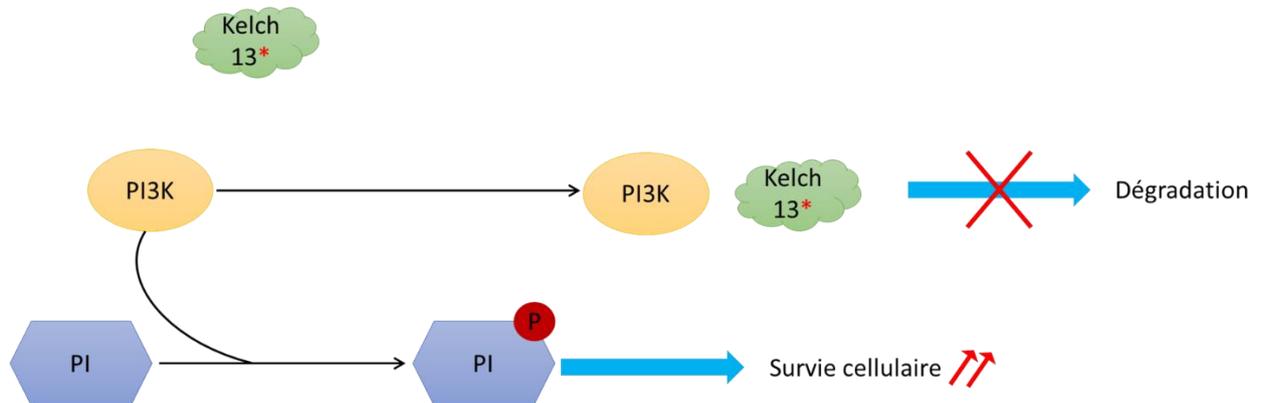


Figure 14 : Conséquences d'une mutation de la protéine Kelch13 sur les voies de signalisation intracellulaires (d'après Burrows, 2015)

2. Mutations du gène pfK13

On vient de voir que le gène pfK13 est un déterminant majeur des mécanismes de la survie cellulaire à travers la régulation de la voie PI3K. Des mutations de différentes natures

ont été rapportées pour ce gène, elles constituent la base des principaux mécanismes de résistance à l'artémisinine²¹ (Figure 15, p.21). Ces mutations sont considérées comme des marqueurs de la résistance à l'artémisinine quand les études cliniques ont prouvé la diminution de l'élimination de *Plasmodium* et que les essais *in vitro* ont montré une baisse de la sensibilité à l'artémisinine sur les souches transfectées avec la mutation. Un cas de clairance lente ou encore une résistance partielle, peut être à l'origine du développement d'une résistance totale, ou encore du développement d'une résistance à une molécule associée à l'artémisinine. Le risque le plus important est la perte totale d'efficacité du traitement en cas de paludisme grave. Dans le cas où une mutation du gène pfK13 est à l'origine d'une diminution de la clairance du parasite, mais que les essais *in vitro* ne sont pas concluants, alors cette mutation reste considérée comme un potentiel marqueur candidat.

Une liste de ces mutations a été établie et est présentée dans le tableau 1.

| VALIDATED | | CANDIDATES/ASSOCIATED | |
|--------------|--------------|-----------------------|-------|
| F446I | P553L | P441L | G538V |
| N458Y | R561H | G449A | V568G |
| M476I | C580Y | C469F | P574L |
| Y493H | | A481V | F673I |
| R539T | | P527H | A675V |
| I543T | | N537I | |

Tableau 1 : Les mutations validées (en gras) et les mutations potentiellement associées à la résistance mais non validées in vitro (colonne de droite)

Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy, 2018 (Creative Commons)

De nombreux travaux étudient les conséquences des mutations de PfK13 sur la résistance à l'artémisinine. Ainsi, les analyses de Straimer et al sur des isolats cambodgiens hautement résistants à l'artémisinine, ont fait ressortir quatre mutations prévalentes Y493H, R539T, I543T et C580Y, qui toutes touchent le domaine propeller (Figure 15, page 21). Ces mutations induisent chez les patients un taux élevé de survie au stade anneau (RSA_{0-3h}) ainsi qu'une clairance lente (demi-vie > 5 heures). Les effets de ces mutations varient en fonction de la localisation de la mutation sur le gène²¹ (Figure 15, page 21).

D'autres études montrent que des mutations peuvent être retrouvées dans le domaine propeller sans induire de résistance car il s'agit de mutations silencieuses (mutation sur la troisième base du codon qui dans la majorité des cas donne le même acide aminé et n'induit donc pas d'altération fonctionnelle de la protéine)²¹ (Figure 15, page 21).

Enfin, des mutations ont également été retrouvées en dehors du domaine propeller, en particulier en position 189 et 252 de la protéine, il s'agit des mutations K189T et E252Q.

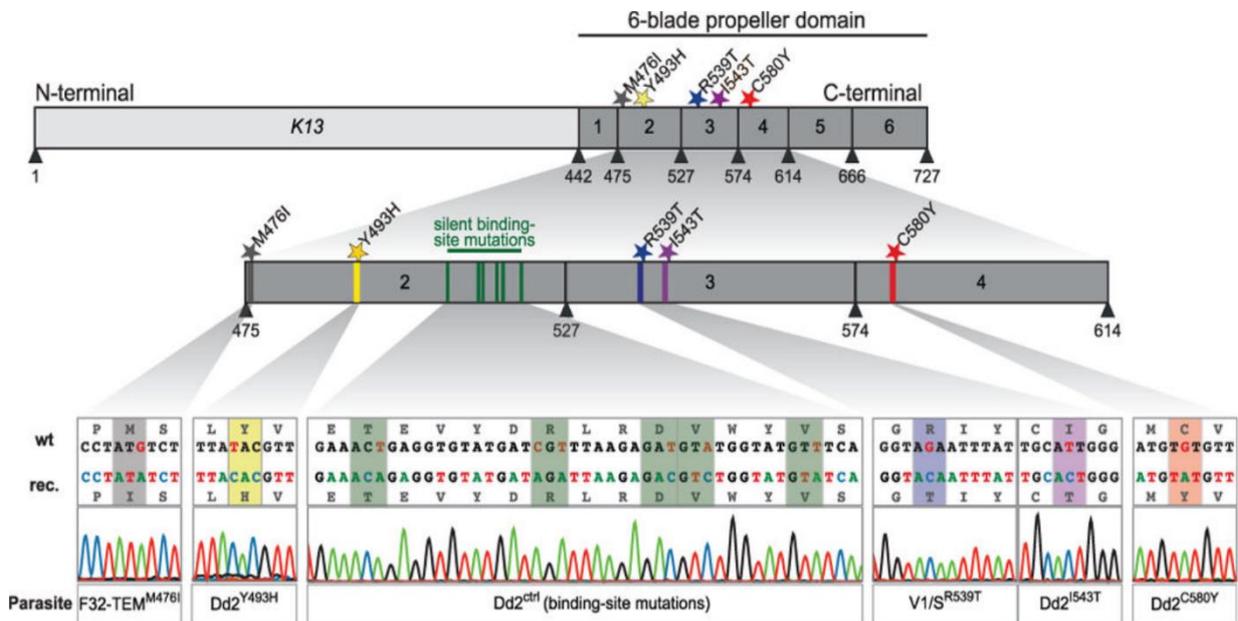


Figure 15 : Mutations du gène Pfk13 et localisation chez *Plasmodium falciparum* (Straimer et al, 2015)

Pour avoir une vision claire de ces données, nous pouvons nous reporter à la méta-analyse réalisée par le consortium WWARN K13 Genotype-Phenotype Study Group d'Oxford, qui compile les publications rapportant les mutations dans le gène Kelch13 chez *P. falciparum* et la clairance parasitaire au cours de traitements par l'artémisinine²². Ce travail a été réalisé à partir de tous les articles publiés entre les années 2000 et 2017 faisant référence à la clairance du parasite de *Plasmodium falciparum* et associant le génotype de pfk13 chez des patients provenant des continents asiatique et africain.

Pour les cas originaires d'Asie, il est mis en évidence deux types de populations, celle dont la clairance parasitaire est rapide avec une diminution de 50% du parasite ($PC_{1/2}$) en 2,7 heures en moyenne, et celle pour laquelle l'élimination est lente avec une baisse de 50% pour un temps avoisinant 6,7 heures (Figure 16, page 22). On observe sur la figure 16 que les mutations les plus fréquentes concernent la mutation E252Q qui substitue un acide glutamique par la glutamine (114 isolats) et la mutation C580Y qui substitue une cystéine par la tyrosine (450 isolats).

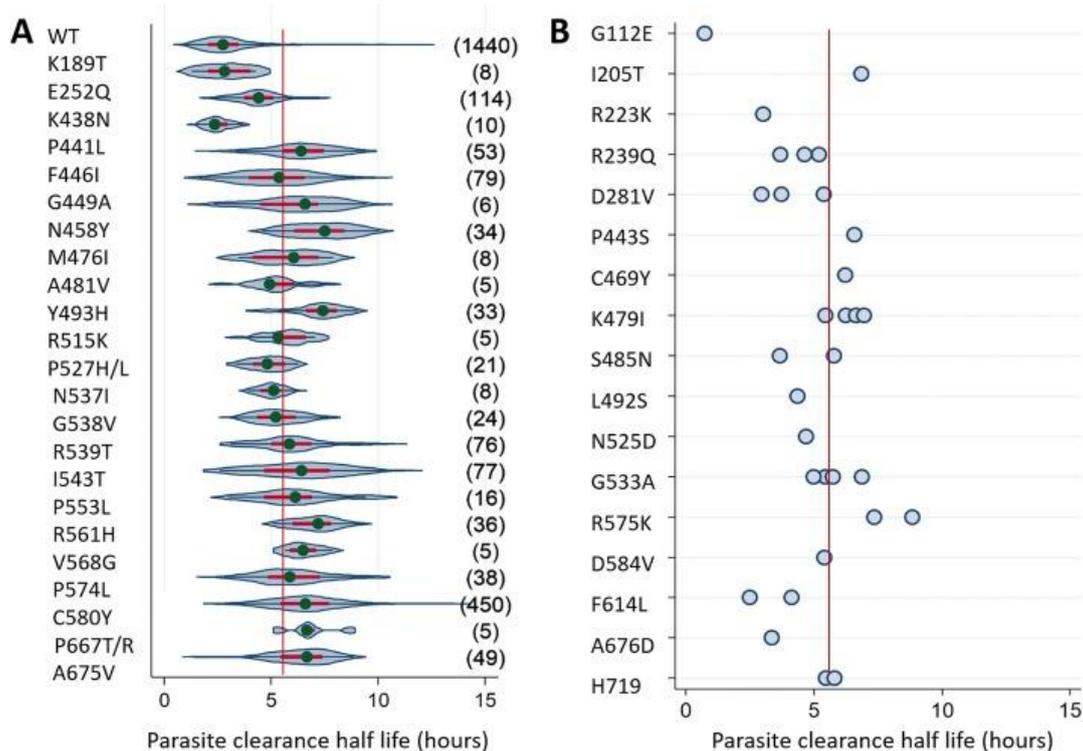
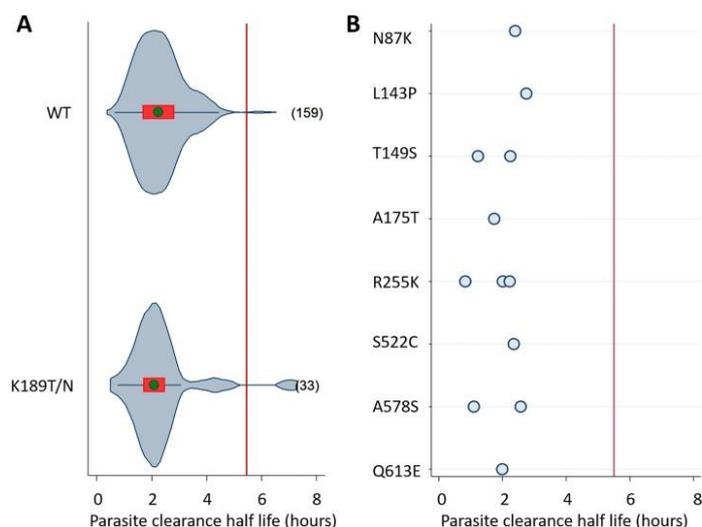


Figure 16 : (A) Demi-vie de clairance parasitaire pour la souche sauvage (WT) ou des souches mutées pour la protéine Kelch13 dans les isolats asiatiques. Entre parenthèse le nombre d'isolats individuels testés pour chaque mutation (B) Demi-vie de clairance parasite pour les mutations retrouvées dans moins de 5 isolats (WWARN K13 Genotype-Phenotype Study Group)

La ligne rouge représente la limite de 5,5 heures au-delà de laquelle la clairance du parasite est définie comme lente. Les points verts représentent eux la moyenne des demi-vies de clairance du parasite en fonction de la mutation présentée.

La mutation E252Q induit une clairance de 50% du parasite en 4,4 heures en moyenne, ralentie par rapport à la souche sauvage. Dans 11% des cas rapportés cependant, la valeur de $PC_{1/2}$ est supérieure à 5,5 heures. De même, ces études montrent qu'entre 2009 et 2014, dans les régions où la prévalence de la mutation C580Y a augmenté, on observe aussi un ralentissement de la clairance du parasite d'une médiane de 5,4 heures en 2009 jusqu'à 7,2 heures en 2014. Il semblerait donc que l'on puisse établir un lien entre l'augmentation du nombre de cas d'une mutation donnée et le ralentissement de la clairance. L'apparition de ces mutations associées à une clairance plus lente est liée par la suite à l'apparition de résistances (Figure 16)²².



*Figure 17 : (A) Demi-vie de clairance parasitaire pour la souche sauvage ou des souches ayant subi des mutations sur la protéine Kelch13 dans les isolats africains. Entre parenthèse le nombre d'isolats individuels testés pour chaque mutation (B) Demi-vie de clairance parasitaire pour les mutations retrouvées dans moins de 5 isolats
WT : Souche sauvage*

Dans les isolats africains les mutations K189T ou K189N, situées en N terminal du domaine propeller (Figure 15, page 21), sont les plus fréquemment retrouvées notamment dans la région d'Ilorin au Nigeria où elles apparaissent dans 76% des isolats²². Cette mutation est très rarement retrouvée dans les isolats asiatiques. Sa fréquence importante en Afrique permet donc d'estimer plus précisément la clairance du parasite.

La PC_{1/2} estimée est de 2,1 heures, ce qui se rapproche très fortement de la PC_{1/2} de la souche sauvage qui est de 2,2 heures.

Parmi les mutations observées dans le domaine propeller, on retrouve principalement les mutations S522C, A578S et Q613E²². Pour ces mutations, la PC_{1/2} inférieure à 2,8 heures en moyenne n'est pas significativement différente des souches sauvages (PC_{1/2} 2,2 heures) (Figure 17)²².

Cette méta-analyse permet de mettre en évidence l'émergence de nouvelles mutations en réponse à l'artémisinine. La nature des différentes mutations et leur position dans le gène varient en fonction de la zone géographique. Dans les isolats africains, on retrouve les principales mutations en dehors du domaine en hélice contrairement aux isolats asiatiques, ce qui, selon les auteurs, reflète une adaptation du parasite en Asie du Sud-Est qui n'est pas encore observée dans les isolats africains. Toutes ces mutations induisent une faible clairance du parasite et la caractérisation de ces mutations pourrait servir de marqueur de réponse à l'artémisinine.

3. Mutations sur des gènes codant pour des transporteurs ABC

Des mutations autres que dans la protéine Kelch13, peuvent être à l'origine de résistances aux anti-paludéens. Chez les eucaryotes, des systèmes d'évacuation des substances xénobiotiques existent via les vacuoles digestives ou les lysosomes. Chez *Plasmodium sp.*, cette élimination s'effectue par le biais de deux transporteurs principaux : la glycoprotéine-P constituée des protéines PfMDR (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 or 2) et PfMRP (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance associated protein) d'une part, et le système de transport du métabolite du médicament formé par la protéine PfCRT (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) d'autre part²³.

Les glycoprotéines-P (transporteurs ABC) sont des pompes ATP-dépendantes qui évacuent les substances xénobiotiques du compartiment cytosolique.

Chez *Plasmodium falciparum*, il y a plusieurs types de transporteurs ABC mais seuls deux d'entre eux sont clairement associés aux mécanismes de résistance : PfMDR-1 et PfCRT (Figure 18).

VD : Vacuole digestive
MEF : Méfloquine
CQ : Chloroquine
★ : Mutation(s)
┣ : Inhibition

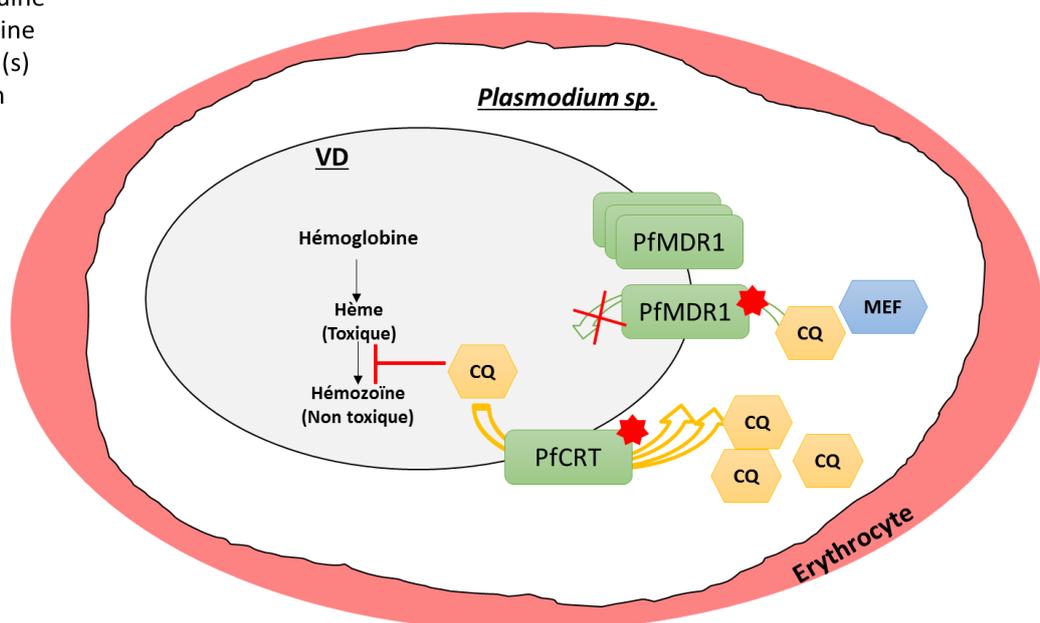


Figure 18 : Mécanismes des résistances aux traitements impliquant les transporteurs ABC

PfMDR-1 est dérégulé soit par amplification génique soit par mutations ponctuelles dans la séquence du gène. A ce jour, seules des mutations ponctuelles ont été retrouvées pour *PfCRT*. En fonction de la nature des altérations, ce ne sont pas les mêmes molécules qui sont rendues inactives.

a. Mutation de PfMDR-1

PfMDR-1 est une protéine ubiquitaire localisée au niveau des membranes des vacuoles digestives. Elle est en grande majorité responsable de l'efflux des médicaments vers le cytosol (Figure 18, page 24).

Cette protéine est dérégulée à travers différents mécanismes qui induisent des résistances à des molécules spécifiques. Ainsi, la surexpression de PfMDR1 induit une résistance à la chloroquine en diminuant sa concentration dans la vacuole digestive et en empêchant ainsi son effet sur l'hème (Figure 18, page 24). A l'inverse, des mutations dans le gène sont associées à des résistances à la méfloquine, à l'artémisinine et ses dérivés²⁴.

Plusieurs mutations ont été caractérisées, parmi lesquelles N86Y, N1042D, S1034C et D1246Y (Figure 19). Comme pour PfK13, on retrouve ces mutations spécifiques de certaines zones géographiques. En Asie et en Afrique se concentre majoritairement la mutation N86Y alors que les trois autres sont principalement retrouvées dans des isolats d'Amérique du Sud.

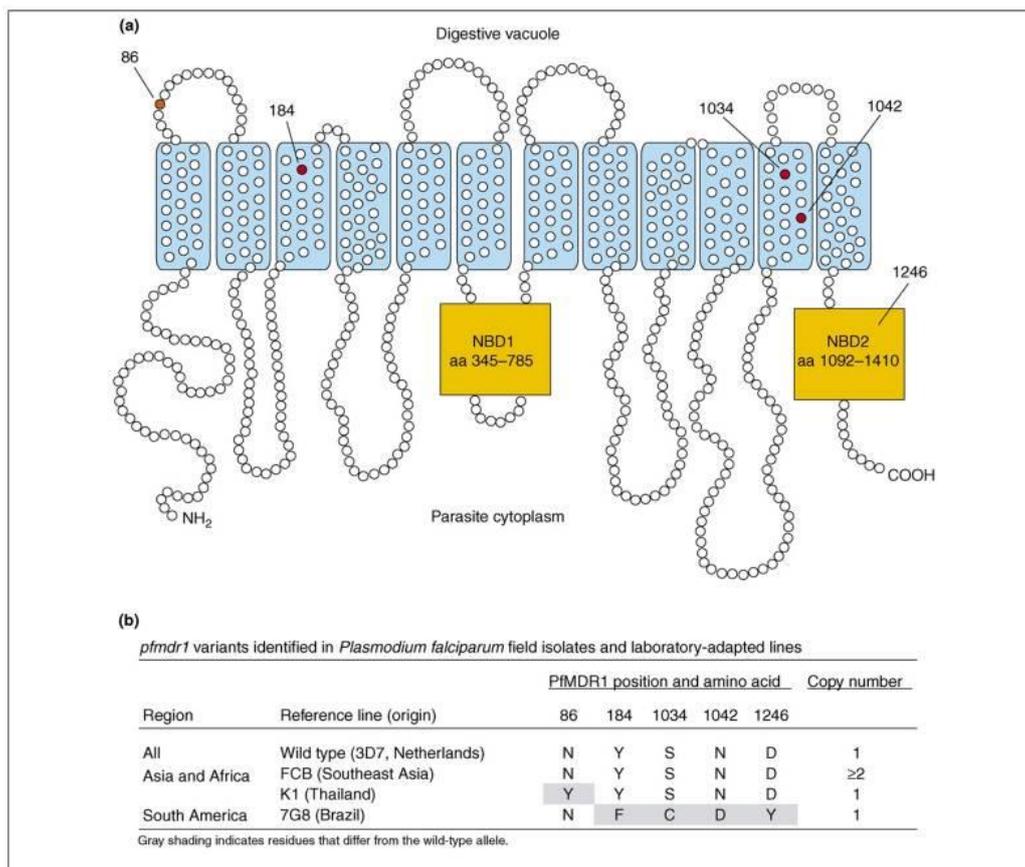


Figure 19 : Mutations de la protéine transmembranaire PfMDR-1 et variants retrouvés dans des isolats de *Plasmodium falciparum* en fonction de la localisation géographique (d'après S.G.Valderramos et D.A.Fidock)

b. Mutation de PfCRT

La protéine PfCRT, lorsqu'elle est mutée, expulse la chloroquine en dehors de la vacuole digestive du parasite et l'empêche donc d'exercer sa fonction (Figures 18, page 24 et Figure 20). Cette protéine présente une grande diversité de mutations parmi des isolats géographiquement différents. De plus, on retrouve fréquemment 4 à 8 mutations sur un même isolat, parmi les 15 mutations recensées.

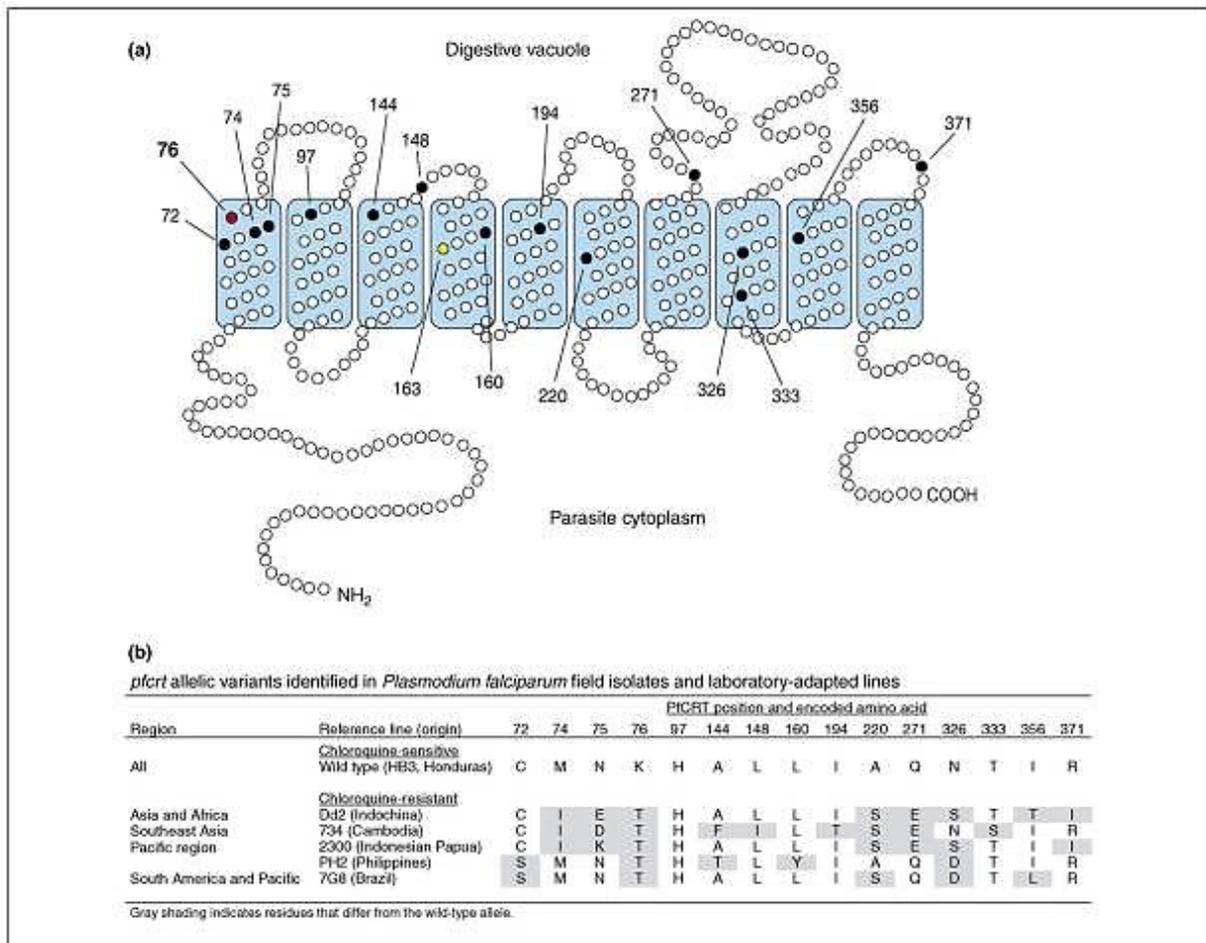


Figure 20 : Mutations de la protéine PfCRT et variants retrouvés dans des isolats de *Plasmodium falciparum* en fonction de la localisation géographique (d'après S. G. Valderramos et D. A. Fidock)

Cette analyse de la diversité géographique des mutations en Asie, notamment à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande, en réponse à l'artésunate, a été étudiée par Dondorp et al²⁵. Les travaux sont réalisés sur deux groupes de patients : le premier composé de 40 patients originaires de Pailin (Ouest du Cambodge) et le second de 40 patients vivant dans la région de Wang-Pha (Nord-Ouest de la Thaïlande), tous atteints par une forme non compliquée de paludisme à *Plasmodium falciparum*.

Dans chacun des deux groupes, la moitié des patients a reçu 2mg/kg d'artésunate en monothérapie pendant 7 jours et l'autre moitié 4mg/kg d'artésunate pendant 3 jours puis de la méfloquine à raison de 15mg/kg le 4^{ème} jour et 10mg/kg le 5^{ème} jour. L'analyse du temps nécessaire à une clairance totale du parasite chez ces deux groupes de patients montre une durée de 84 heures pour la région de Pailin quelle que soit la thérapie utilisée et de 60 heures en monothérapie ou 48 heures en bithérapie, à Wang Pha (Figure 21).

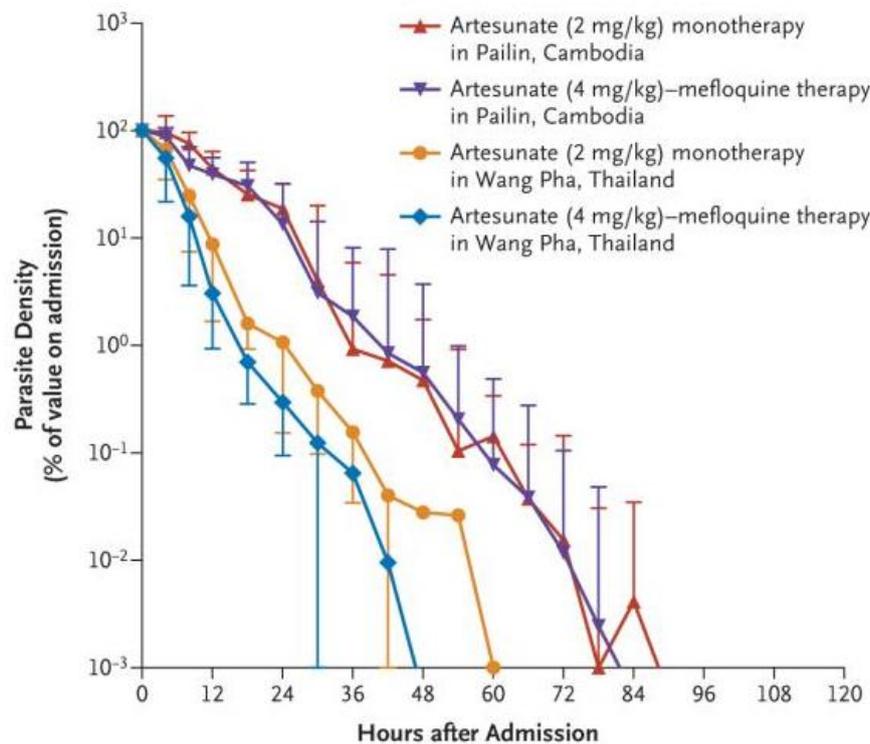


Figure 21 : Densités parasitaires (log10) en fonction du temps pour les 20 patients dans chacun des sous-groupes de traitement. (Dondorp et al, 2009)

L'analyse des mutations dans les transporteurs ABC chez ces deux groupes de patients a donné les résultats présentés dans le tableau suivant :

| | Gène Pfmdr-1 | | | Gène Pfprt |
|-----------------|---------------|--------------------------------|-------------------|---------------|
| | Amplification | 1 copie mutée (mutation Y184F) | 1 copie non mutée | Mutation K76T |
| Groupe Pailin | 2 | 32 | 6 | 40 |
| Groupe Wang-Pha | 18 | 12 | 10 | 40 |

Tableau 2 : Mutations ou amplifications de gènes observées dans les groupes de patients (d'après Dondorp et al.)

De récentes études réalisées au Cambodge ont permis d'établir que l'augmentation du nombre de copies du gène Pfmdr1, gène déjà responsable, lorsqu'il est muté, de la résistance à la méfloquine, peut être associée au taux d'échec de la thérapie associant l'artésunate et la méfloquine. Dans l'étude de Dondorp et al, l'efficacité de l'association artésunate-méfloquine dans le groupe Pailin est bonne, ce qui est probablement dû au fait que chez seulement 5% des patients de ce groupe le parasite présente une amplification du gène.

Il apparaît clairement, d'après ces données, que l'utilisation de thérapies groupées associant des dérivés d'artémisinine avec d'autres antipaludéens doit être envisagée chez des patients infectés par des parasites ne présentant pas d'amplification du gène Pfmdr-1.

IV. L'artémisinine

1. Armoise annuelle (*Artemisia annua*)

a. La plante

L'Armoise annuelle est une plante de la famille des Astéracées, originaire d'Asie, mais présente en Europe (Centre et Sud) et en Amérique du Nord (Figure 22, page 29). Elle est signalée dans la pharmacopée traditionnelle chinoise deux siècles avant notre ère pour traiter les fièvres et la malaria⁶.



Figure 22 : Artemisia annua L. (Kristian Peters-Wikimedia Commons)

Au début des années 1970, on isole des parties aériennes séchées de cette plante la molécule possédant des propriétés antipaludiques, l'artémisinine²⁶. L'artémisinine appartient à la famille des lactones sesquiterpéniques peroxydées. Sa concentration varie selon l'environnement dans lequel pousse la plante (Figure 23)²⁷. Le rendement maximal (R=0,86%) est obtenu chez les plantes jeunes (5 mois), il diminue ensuite au cours du vieillissement de la plante²⁶.

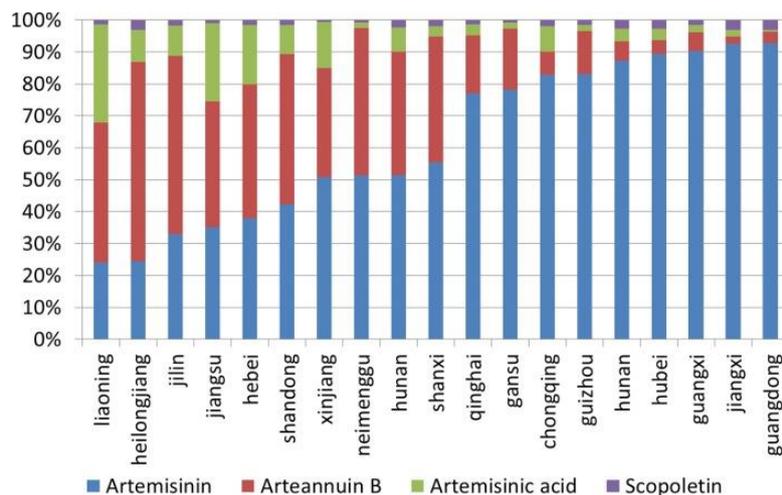


Figure 23 : Concentrations des différentes constituants chimiques d'A. annua en fonction de la région récolte en Chine.(Zhang, 2017).

En fonction des régions (en abscisse) on note une concentration d'artémisinine (en bleu) variant de 20 à 90% environ. La concentration en dérivés arteannuine B et acide artémisinique varie de 80 à 5%.

b. Biosynthèse de l'artémisinine

Dans les pays industrialisés, l'artémisinine et ses dérivés sont produits par synthèse chimique (Figure 24). L'artémisinine est issue du farnésyl pyrophosphate (FPP) qui est composé de deux molécules d'isoprénoïdes C-5 (issues de la voie du mévalonate cytosolique) et d'une molécule d'isoprénoïde (issue de la voie non mévalonate). Le farnésyl pyrophosphate est par la suite cyclisé pour former l'amorphe-4,11-diène, qui est oxydé pour devenir l'alcool artémisinique puis l'aldéhyde artémisinique²⁸. C'est le pont endopéroxyde de l'artémisinine qui est à la base de son activité antipaludique comme nous le verrons dans les paragraphes suivants.

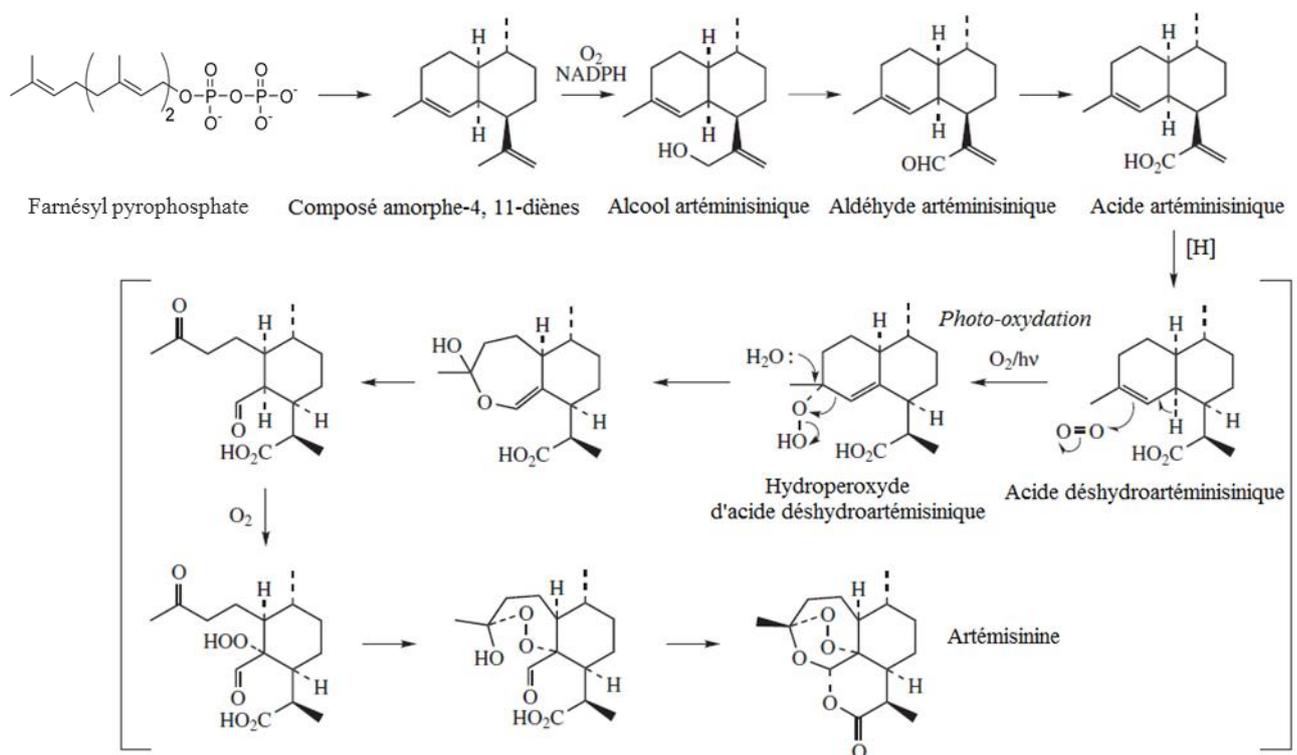


Figure 24 : Biosynthèse de l'artémisinine (Mephisto spa-Wikimedia Commons)

Les dérivés de l'artémisinine, dihydroartémisinine (DHA), artéméthér et artésunate sont également produits par synthèse chimique (Figure 25, page 31)²⁹.

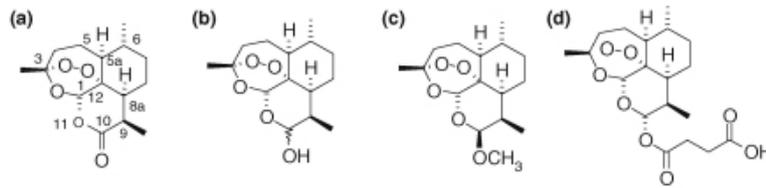


Figure 25 : Structure chimique de l'artémisinine et de ses dérivés, Krishna et al. 2008

A partir de la molécule d'artémisinine (a) les dérivés suivants sont obtenus : dihydroartémisinine (b), artéméther (c), artésunate (d)

c. Mécanisme d'action

L'artémisinine est active sur tous les stades de multiplication du parasite dans la phase endo-érythrocytaire, notamment sur les stades précoces. Son action cible principalement les trophozoïtes (la phase « ring » ou phase anneau) et schizontes ainsi que le stade gamétocyte. En revanche, elle n'est presque pas active sur les autres phases du cycle du parasite (Figure 26)^{7,30}. En quelques heures, la maturation du parasite est bloquée ainsi que le mécanisme de séquestration des globules rouges parasités dans les micro vaisseaux.

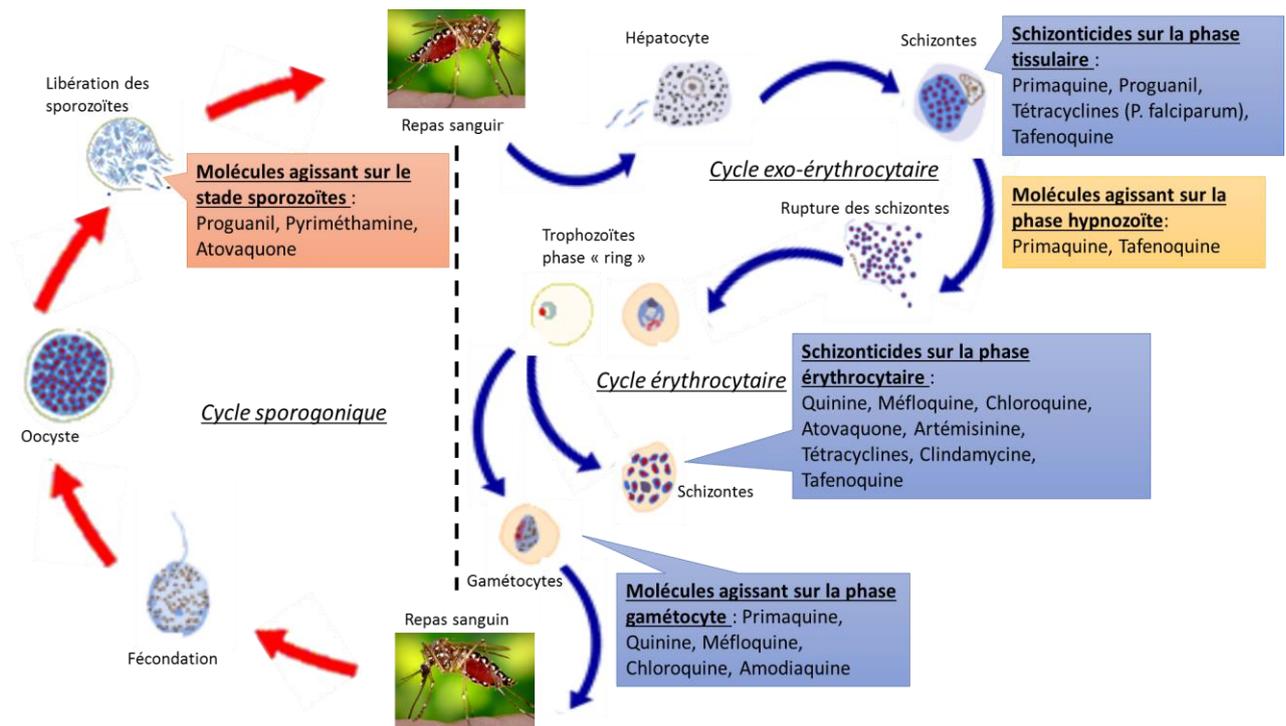


Figure 26 : Sites d'action des différents traitements préventifs et curatifs contre les infections à Plasmodium chez l'Homme, d'après dpd.cdc.gov Wikimedia Commons

L'artémisinine et ses dérivés sont des prodrogues, dont l'activation nécessite une source de fer qui pourrait être l'hème ou le fer ferreux libre³⁰. Dans la première partie du cycle parasitaire, l'activation de l'artémisinine s'effectue principalement grâce à l'hème biosynthétisé par le parasite puis au dernier stade s'ajoute l'activation par l'hème issu de la digestion de l'hémoglobine (Figure 27)³⁰.

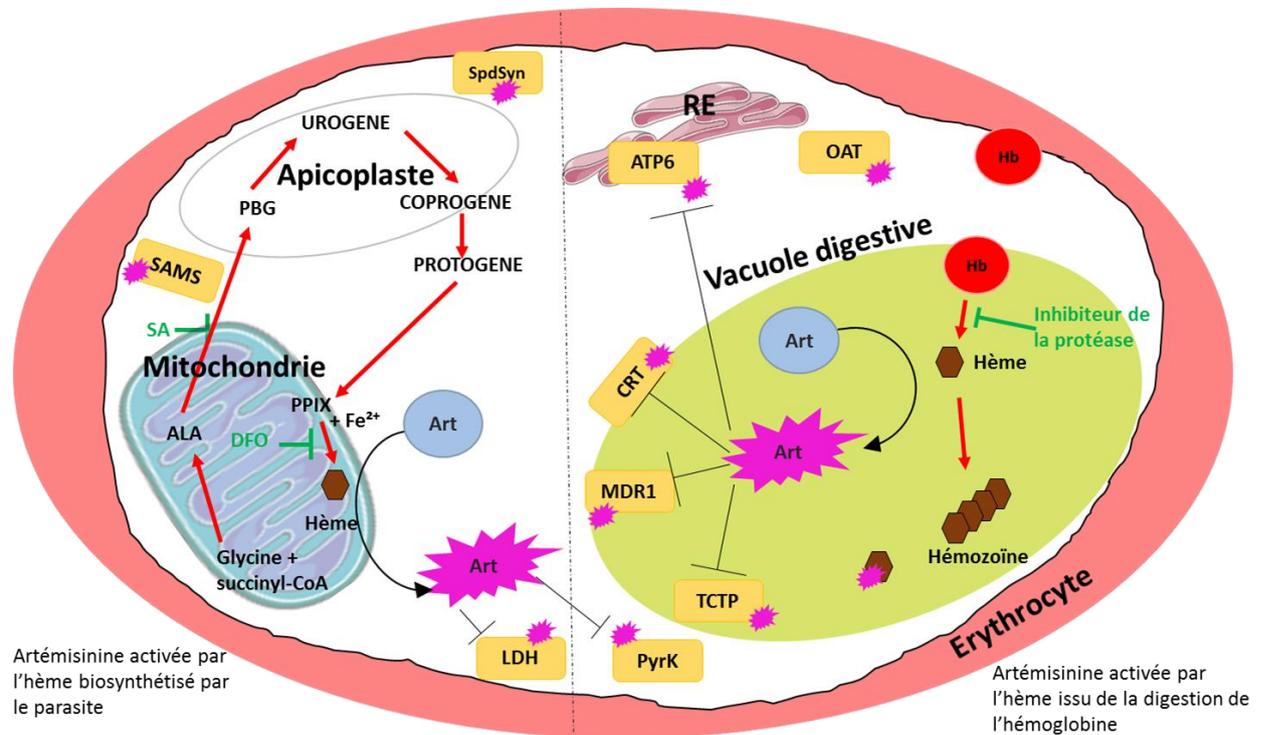


Figure 27 : Modèle résumant le mécanisme d'activation de l'artémisinine par l'hème d'après Wang, 2015

L'activation de l'artémisinine repose sur deux mécanismes : au stade précoce, activation par l'hème biosynthétisé dans le parasite au niveau de la mitochondrie (à gauche) puis par l'hème relargué par digestion de l'hémoglobine dans la vacuole digestive (à droite). Les cibles de l'artémisinine active sont indiquées (en jaune). RE (Réticulum endoplasmique), Hb, (Hémoglobine), MDR1 (Multidrug resistance protein 1), LDH (Lactate déshydrogénase), PyrK (Pyruvate Kinase), TCTP (Translationally controlled tumour protein), CRT (Chloroquine resistance transporter), OAT (Ornithine aminotransferase), ATP6 (ATP synthase 6), SpdSyn (Spermidine synthase), SAMS (S-adenosylmethionine synthase), PPIX (Protoporphyrine IX), Art (Artémisinine active en rose et inactive en bleu)

Cette activation induit un clivage de la liaison endopéroxyde de la molécule créant un stress oxydatif à l'origine de lésions cellulaires (Figure 28, page 33). Ainsi, la survie des parasites lorsqu'ils sont exposés à des traitements antipaludéens dépend de leur capacité à se protéger de ces dommages cellulaires.

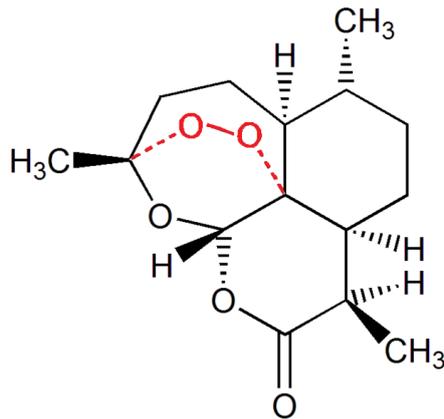


Figure 28 : Pont endopéroxyde de l'artémisinine (Wikimedia Commons)

2. Evaluation des effets antipaludéens des tisanes d'Artemisia

Des essais *in vivo* ont été effectués pour chercher à caractériser l'effet antipaludéen de l'artémisinine telle qu'elle est utilisée en médecine traditionnelle, principalement sous forme de tisane.

Dans une première étude, Elfawal et al, comparent l'utilisation d'artémisinine pure (AN) et d'*Artemisia annua* sous forme de plante entière séchée réduite en poudre (WP) *in vivo* chez la souris. Deux doses différentes sont utilisées : une dose faible (LO) à 24mg/kg et une dose forte (HI) à 120mg/kg³¹. Ce test a été réalisé pour une mono-dose de traitement. Le groupe témoin (CON) correspond à des souris nourries et élevées dans les mêmes conditions, mais non traitées.

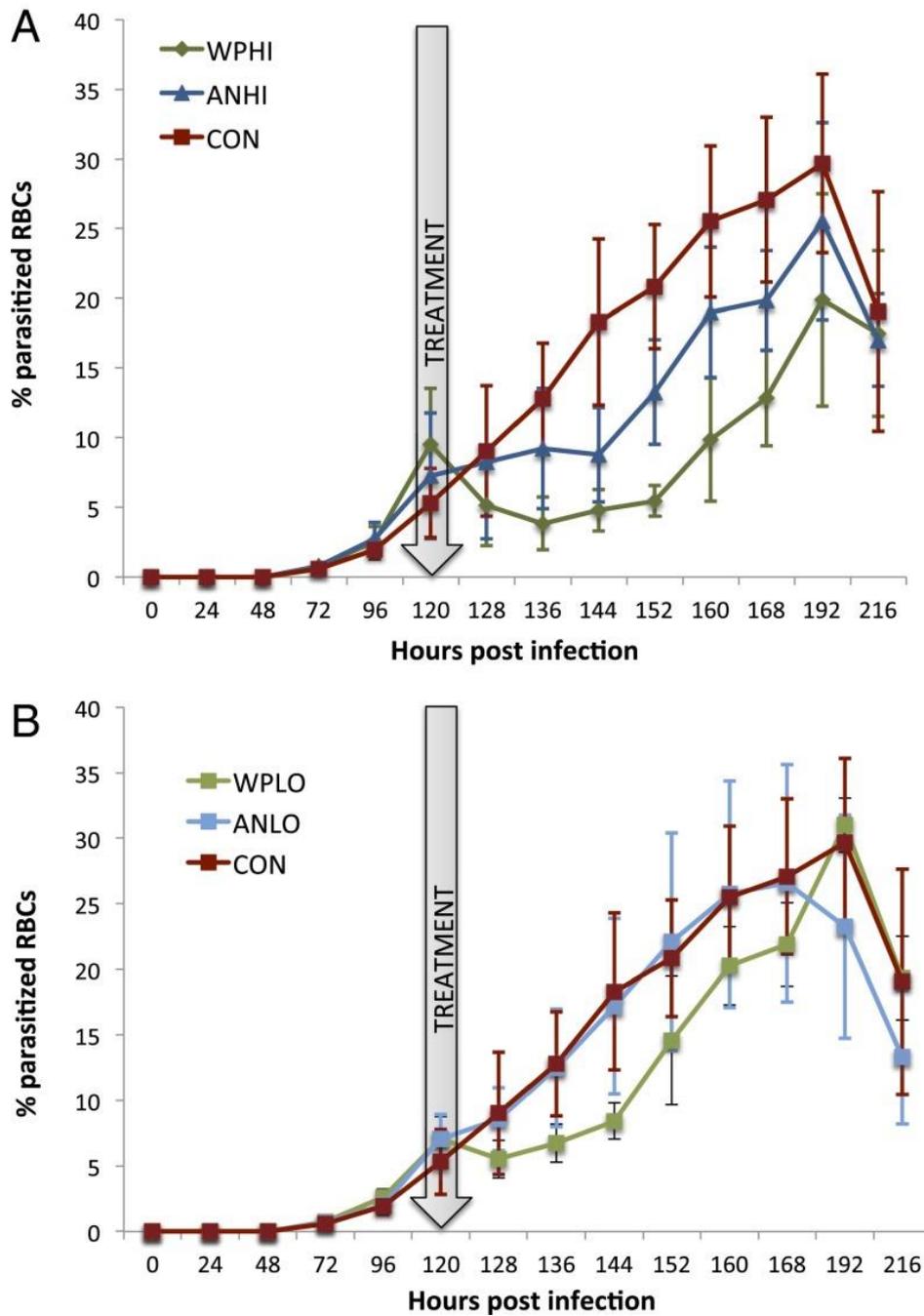


Figure 29 : Variation du pourcentage de globules rouges parasités avant et après traitement par artémisinine pure (AN) et *Artemisia annua* (WP) à la dose de 120mg/kg (Figure 29A) ou 24mg/kg (Figure 29B). CON : groupe témoin, souris non traitées (Elfawal et al; 2015)

Le premier graphique représente le pourcentage de parasites retrouvés dans la circulation sanguine chez des souris infectées par *Plasmodium yoelii*, un *Plasmodium* de la souris résistant à l'artémisinine. Les effets d'un traitement par artémisinine pure ou par *Artemisia annua* à forte dose, administré 120 heures après l'infection, sont évalués au cours du

temps. Seize heures après le début du traitement (136h), le groupe ayant reçu *Artemisia annua* sous forme de plante entière a deux fois moins de parasites dans le sang (Figure 29A, page 34). Lorsque les doses de traitement sont cinq fois plus faibles, on remarque alors que les courbes représentant la parasitémie chez les souris témoins et chez les souris traitées par artémisinine pure sont quasiment confondues, ce qui montre une absence d'efficacité de l'artémisinine pure à cette faible dose. En revanche, pour le groupe de souris traités par *Artemisia annua*, la parasitémie diminue légèrement et 22 heures après traitement, la parasitémie est à nouveau deux fois moins importante dans ce groupe (Figure 29B, page 34). L'analyse des courbes montre cependant une hausse de la parasitémie une vingtaine d'heures après traitement, probablement liée au fait que le traitement n'est donné qu'en mono-dose (Figure 29 A et B, page 34).

Pour un suivi au cours du temps, des souris sont ensuite traitées par *Artemisia annua* ou artémisinine pure pendant neuf jours consécutifs à la dose de 120mg/kg/j à partir de deux jours post-infection. La parasitémie est représentée dans la figure 30.

Sur ce graphique on peut remarquer que la parasitémie reste très faible (<2%) dans le groupe traité par *Artemisia annua* au cours des huit premiers jours puis diminue encore pour finir par être nulle au bout du quinzième jour (Figure 30).

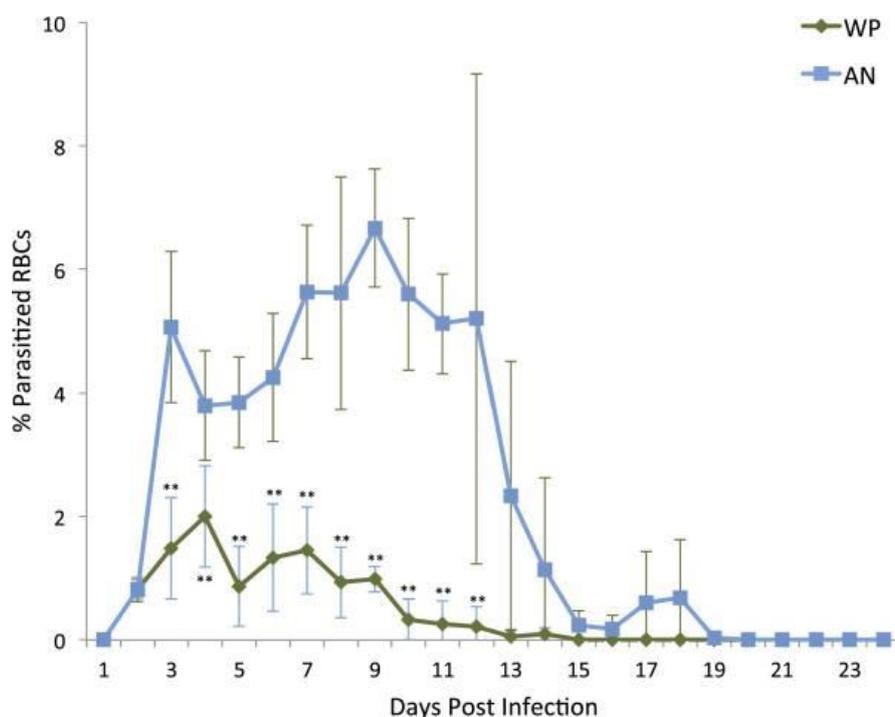


Figure 30 : Variation du pourcentage de globules rouges parasités par *P. yoelii* résistant à l'artémisinine. J0 : inoculation du parasite et J2 à J10 inclus traitement par artémisinine pure (AN) ou *Artemisia annua* plante entière (WP) à la dose de 120mg/kg (Elfawal)

Dans le groupe traité par artémisinine pure, la parasitémie croît jusqu'à atteindre 7% puis diminue à son tour et disparaît vers le dix-neuvième jour (Figure 30, page 35).

Cet essai met en évidence le fait que cette souche de *Plasmodium* résistante à l'artémisinine pure reste sensible au totum moléculaire présent dans la plante entière. Cette activité pourrait être due à une synergie d'action entre l'artémisinine et les autres substances chimiques contenues dans la plante.

Dans une seconde étude, un essai randomisé a été réalisé sur des patients vivant dans la province de Sud-Kivu, en République Démocratique du Congo, par Markus S. Mueller et son équipe³². Les patients inclus dans l'étude répondent aux critères suivants : présence depuis au minimum 5 ans dans la région, infection par *P. falciparum* avec une parasitémie $>2000/\mu\text{L}$, ≥ 18 ans et présence d'au moins un des symptômes suivants : fièvre, fatigue, nausées, vertiges, céphalées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, frissons ou douleurs articulaires³². Ont été exclus, les femmes enceintes ou allaitantes, les patients ayant pris des traitements antipaludéens au cours des 2 semaines précédentes, des traitements médicaux traditionnels ou modernes pour d'autres pathologies.

Trois groupes ont été formés. Le premier (A5) avec des patients traités par tisanes d'*Artemisia annua* (5g/L de plantes sèches) à la dose d'un litre par jour pendant 7 jours, le second (A9) avec des patients traités par tisanes d'*Artemisia annua* (9g/L de plantes séchées) à la même dose que précédemment et le troisième groupe (QN) traité par des comprimés de sulfate de quinine à la dose de 500mg trois fois par jours pendant 7 jours (Figure 31, page 37). La concentration en artémisinine des plantes séchées était de 1,4 %. La tisane est prise en quatre fois 250mL dans la journée, la première fois le matin, puis à midi, à 16h et à 20h.

Les critères d'échecs du traitement sont : le développement d'un paludisme sévère, une parasitémie à J3 supérieure ou égale à la parasitémie à J0, la présence de parasites à J7 mais aussi l'absence de parasites à J7 avec un retour des parasites à J35. Des examens sont réalisés sur les patients à J7, J14, J28 et J35 pour déterminer si le traitement fonctionne ou non et pour exclure et traiter les patients ne répondant pas bien avec des antipaludéens de référence.

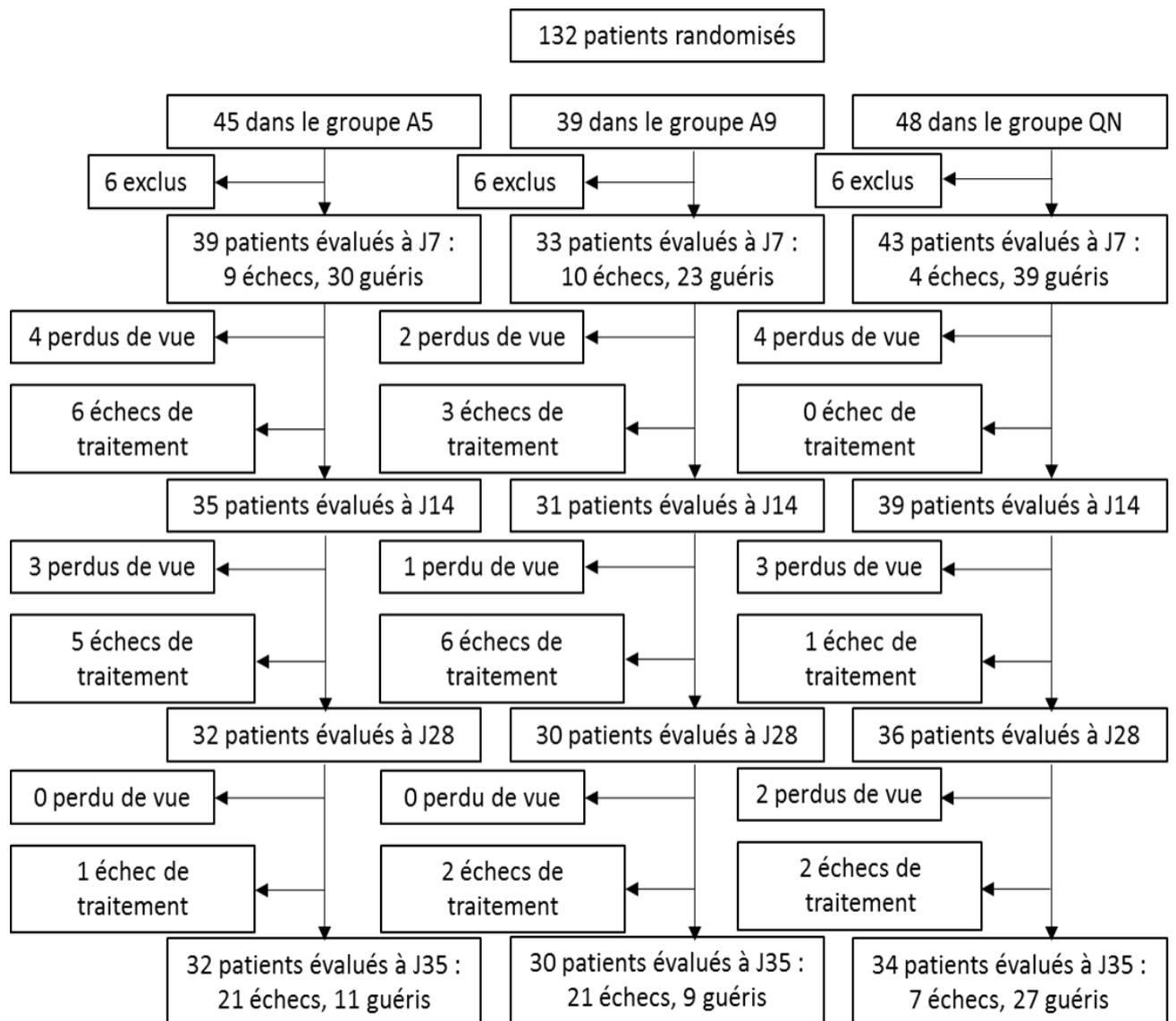


Figure 31 : Résultats des essais réalisés comparant les effets de tisanes d'Artemisia annua à 5 (A5) et 9 (A9)g/L et celui de la quinine (QN) sur un groupe de patients impaludés. D'après Muller et al ; 2004

Le terme « guéris » correspond à des patients pour lesquels le diagnostic par frottis sanguin est négatif.

| | Tisane d' <i>Artemisia annua</i> (5g/j) | Tisane d' <i>Artemisia annua</i> (9g/j) | Quinine (1500mg/j) |
|---|---|---|--------------------|
| Taux de guérison à J7 | 30/39 (77%) | 23/33 (70%) | 39/43 (91%) |
| Taux de guérison à J14 | 20/35 (57%) | 18/31 (58%) | 35/39 (90%) |
| Taux de guérison à J28 | 12/32 (38%) | 11/30 (37%) | 31/36 (86%) |
| Taux de guérison à J35 | 11/32 (34%) | 9/30 (30%) | 27/34 (79%) |
| Symptômes* | | | |
| Fièvre | 31/34 (91%) | 26/32 (81%) | 34/37 (92%) |
| Frissons | 23/25 (92%) | 18/18 (100%) | 24/24 (100%) |
| Fatigue | 29/33 (88%) | 19/26 (73%) | 23/33 (70%) |
| Vertiges | 17/21 (81%) | 18/20 (90%) | 21/27 (78%) |
| Nausées | 11/12 (92%) | 5/6 (83%) | 7/11 (64%) |
| Douleurs articulaires | 22/24 (92%) | 19/22 (86%) | 18/19 (95%) |
| Vomissements | 6/7 (86%) | 4/4 (100%) | 13/17 (76%) |
| Céphalées | 26/30 (87%) | 22/30 (73%) | 34/39 (87%) |
| Douleurs abdominales | 8/8 (100%) | 10/12 (83%) | 12/14 (86%) |
| Diarrhées | 1/1 (100%) | 1/1 (100%) | 0/0 |
| * : Nombre de patients avec amélioration ou disparition du symptôme à J3 / Nombre de patients avec ce symptôme à J0 | | | |

Tableau 3 : Pourcentage de patients dont la parasitémie est nulle en fonction du temps et du traitement donné et pourcentage de patients sans symptômes à J3 d'après Muller et al ; 2004

Cet essai nous montre que le traitement par *Artemisia annua* agit sur la parasitémie en la diminuant très largement au cours des 7 jours de traitement. On observe respectivement des taux de guérison de 77% et 70% pour les groupes A5 et A9. En revanche, à J35, une forte recrudescence du parasite est observée avec un taux de guérison qui passe alors à 34% (A5) et 30% (A9).

La majorité des symptômes a disparu au cours de 3 premiers jours du traitement quel qu'il soit ce qui démontre l'effet antipaludéen de la tisane d'*Artemisia annua* (Tableau 3). La recrudescence, que l'on observe aussi dans l'étude réalisée par Elfawal chez la souris, peut s'expliquer par une durée ou une dose de traitement non adaptée ou encore une adaptation du parasite.

Depuis plusieurs années, un groupe de chercheurs composé de Jérôme Munyangi, un médecin de l'Université de Médecine de République Démocratique du Congo, de Pamela Weathers du département de biologie et biotechnologie de l'institut polytechnique de Worcester aux Etats-Unis ainsi que d'autres scientifiques, a choisi de se pencher sur l'utilisation de l'*Artemisia annua* et de l'*Artemisia afra* (autre espèce d'*Artemisia* contenant d'infimes traces d'artémisinine) sous forme de tisanes dans la lutte contre le paludisme. Ils ont réalisé un essai

clinique randomisé, en double aveugle, qui reste le plus abouti à ce jour pour évaluer chez l'Homme l'efficacité de cette tisane³³.

957 patients atteints de paludisme à *Plasmodium falciparum* ont été sélectionnés selon des critères stricts. Il ne pouvait s'agir que d'adultes et d'enfants de plus de 5 ans dont la température axillaire était supérieure à 37,5°C et dont la parasitémie se situe entre 2 000 et 200 000 trophozoïtes/ μ L de sang. De plus, étaient exclus de l'essai tous les patients atteints de paludisme sévère (dont le pronostic vital était en jeu dans l'immédiat), rachitiques, pris de vomissements et de diarrhées fréquentes, atteints d'autres infections, allergiques aux ACTs, les femmes enceintes, mais aussi les patients traités par des antipaludéens dans les 7 jours précédents l'étude.

Avant que ne débute cet essai, et selon la procédure recommandée par l'OMS, les patients ont subi un test de diagnostic rapide (TDR) pour confirmer l'infection. Des frottis minces et gouttes épaisses ont été réalisés pour connaître la concentration en trophozoïtes/ μ L de sang ainsi que pour noter la présence ou non dans le sang de gamétocytes.

Les 957 patients ont été répartis dans les 2 groupes et il restait à la fin de l'essai :

- 472 patients traités par ASAQ, qui est l'association d'artésunate et de l'amodiaquine, deux antipaludéens de référence (Figure 32).
- 471 traités par des tisanes d'*Artemisia* (248 de l'espèce *A. annua* originaire de Chine et 223 l'espèce *A. afra* présente en Afrique du Sud), (Figure 33).

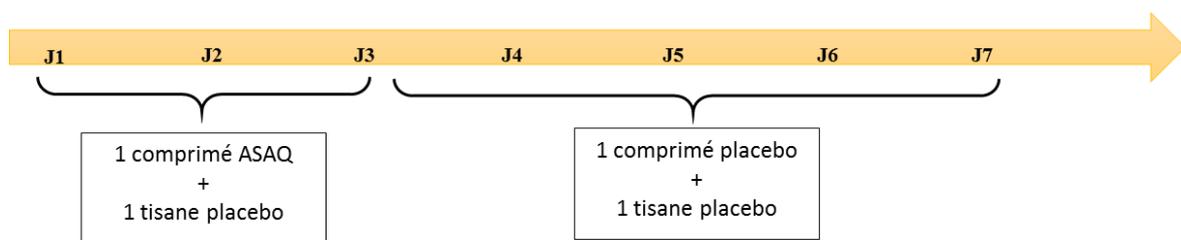


Figure 32 : Schéma de prise du traitement pour le groupe ASAQ

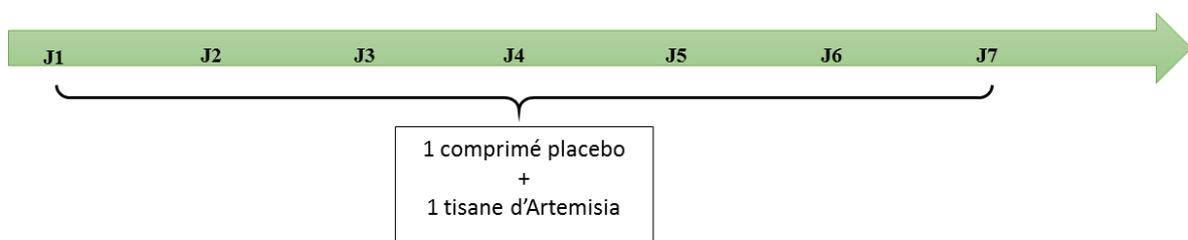


Figure 33 : Schéma de prise du traitement pour le groupe Artemisia sp.

La tisane d'*Artemisia sp* a été réalisée en infusant 5 grammes de feuilles et brindilles séchées, dans de l'eau pendant 10 minutes. La préparation est ensuite filtrée et consommée à la dose d'un litre par jour réparti en 0,33 litre toutes les 8 heures.

Les comprimés d'artésunate/amodiaquine existent en trois dosages différents : 25mg/65,5mg ; 50mg/135mg et 100mg/270mg, ils sont proposés aux patients à la posologie habituelle soit 4mg d'artésunate et 10 mg d'amodiaquine par kilo de poids corporel en une prise par jour pendant 3 jours consécutifs. Pour cette raison, dans le groupe ASAQ, les patients reçoivent des comprimés placebo pendant les quatre derniers jours. Les placebos sont composés de saccharose et de glucose sous forme de comprimés achetés dans des pharmacies. La tisane placebo elle, est réalisée, après suggestion de l'OMS, avec de très faibles doses d'*Artemisia sp*. à des concentrations de 0,2g/L de tisane soit 25 fois moins que dans la tisane « traitement ».

28 jours après le début du traitement, 943 patients faisaient toujours partie de l'essai. Chez 344 d'entre eux une parasitémie persistait et parmi eux seulement 9 traités par *A. annua* et 25 par *A. afra*. En revanche, les 310 autres patients présentant une parasitémie avaient reçu un traitement par ASAQ. Parmi ceux-ci, dix avaient des gamétocytes détectables à J28 alors qu'aucun gamétocyte n'a été détecté à partir de J14 dans le groupe traité par *Artemisia sp*. Il semblerait donc que l'*Artemisia sp*. agisse aussi au niveau des gamétocytes.

Au cours du traitement, les patients traités par la tisane d'*Artemisia afra* ont présenté une hémoglobine stable d'environ 11g/dL, alors que les patients traités par *Artemisia annua* ainsi que par ASAQ ont présenté une baisse du taux d'hémoglobine à 9g/dL. L'artémisinine est connue pour diminuer le taux d'hémoglobine chez les patients traités, la différence observée est considérée par les auteurs comme cohérente avec le taux très faible d'artémisinine dans *Artemisia afra*³³.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent qu'il existerait une efficacité comparable pour les sous-groupes traités avec les tisanes d'*A. annua* ou *A. afra*, malgré les différences de composition dans ces deux espèces, en particulier le faible taux d'artémisinine chez *A. afra*. Ces données confirment donc, d'une part que l'artémisinine n'est probablement pas la seule molécule dans ces plantes présentant une activité contre le paludisme, d'autre part qu'il pourrait exister une synergie entre plusieurs molécules.

Au cours de cet essai, les effets indésirables de chaque groupe ont été relevés (Tableau 4)

| Effets indésirables observés | Nombre de sujets dans le groupe <i>Artemisia</i> | Nombre de sujets dans le groupe ASAQ |
|-------------------------------------|---|---|
| Douleurs abdominales | 0 | 25 |
| Asthénies | 0 | 30 |
| Diarrhées | 0 | 5 |
| Somnolences | 0 | 3 |
| Toux grasses | 0 | 1 |
| Hypoglycémies | 0 | 20 |
| Insomnies | 0 | 10 |
| Nausées | 10 | 30 |
| Prurits | 0 | 35 |
| Vertiges | 0 | 1 |
| Vomissements | 15 | 50 |

Tableau 4 : Effets indésirables relevés au cours de l'essai dans chacun des deux groupes, d'après Munyangi et al ; 2019

D'une manière générale, très peu d'effets indésirables ont été relevés dans le groupe traité par tisanes d'*Artemisia sp.* Il s'agit principalement de nausées et de vomissements pouvant être, pour certains, causés par l'infection elle-même. Dans le groupe ASAQ, ces effets indésirables sont plus nombreux, mais restent limités et sans gravité.

L'efficacité plus faible de l'association artésunate-amodiaquine pourrait être liée à une pharmaco-résistance, fréquente en République démocratique du Congo, ou encore une éventuelle interaction entre l'association de molécules et les 0,2g/L d'*Artemisia* contenus dans la tisane placebo.

L'ensemble de ces études montre que l'artémisinine n'est pas la seule molécule active contre *Plasmodium sp.* présente dans *Artemisia sp.* De plus, il apparaît que d'autres composés de cette plante agissent de manière concomitante pour potentialiser l'effet antipaludéen.

John O. Suberu et son équipe, ont publié en 2013 un article sur les composants d'*Artemisia annua* et leurs potentiels effets synergiques ou antagonistes³⁴.

De nombreuses molécules sont présentes dans les extraits aqueux d'*Artemisia annua*. On retrouve une trentaine de sesquiterpènes ainsi que plus de 35 flavonoïdes.

Dans le tableau 5 et la figure 34 (p.42) sont présentés les composants les plus fréquemment retrouvés dans les infusions d'*Artemisia annua*. Parmi eux, on trouve des acides caféoylquiniques qui sont des esters issus d'acides caféique et quinique. De nombreux effets pharmacologiques ont été mis en évidence dans cette famille d'acides caféoylquiniques parmi lesquels des effets hépato-protecteurs, antioxydants, antibactériens³⁴...

| Composés | Quantité (mg/L de tisane)* |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Artémisinine | 47,5 ± 0,8 |
| Arteannuin B | 1,3 ± 0,0 |
| Acide dihydroartémisinique | 70,0 ± 0,3 |
| Acide caféique | 0,8 ± 0,0 |
| Acide 3,5-di-caféoylquinique | 57,0 ± 1,7 |
| Acide 3-caféoylquinique | 72,0 ± 1,6 |
| Acide 4-caféoylquinique | 20,4 ± 1,6 |
| Acide 4,5-di-caféoylquinique | 31,5 ± 4,0 |
| Acide 5-caféoylquinique | 9,0 ± 0,7 |
| Isovitexin | 105,0 ± 7,2 |
| Acide rosmarinique | 1,1 ± 0,0 |

Tableau 5 : Composés majoritaires retrouvés dans les infusions d'Artemisia annua (dosage par HPLC), d'après Suberu et al ; 2013

* La tisane est préparée à partir de 5g de plante séchée infusés dans 1 litre d'eau bouillante.

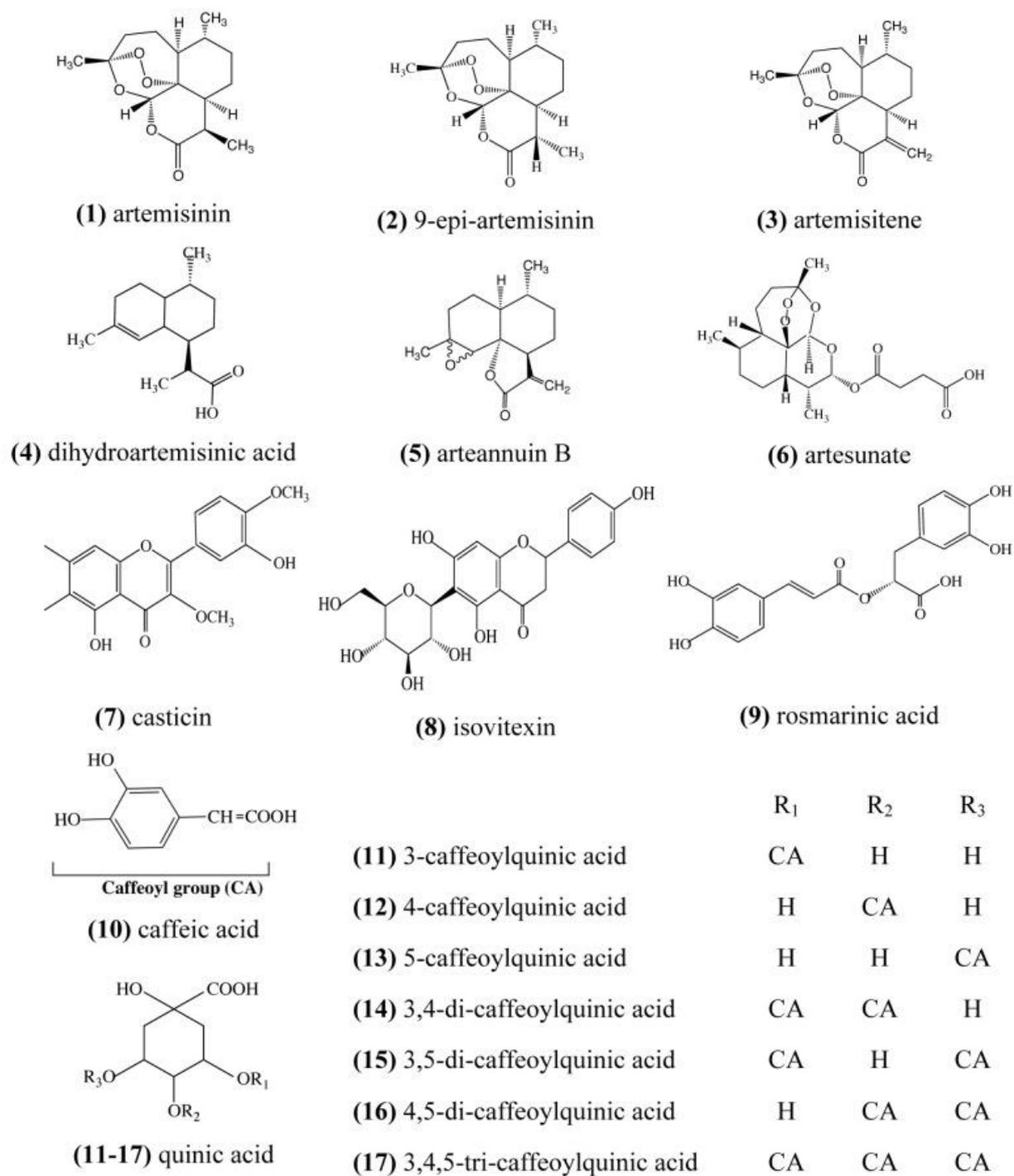


Figure 34 : Molécules présentes dans les extraits aqueux d'*Artemisia annua* (Suberu et al ; 2013)

Dans le tableau 6, on peut voir que la concentration d'artémisinine nécessaire pour inhiber 50% du parasite est trois fois supérieure à celle de l'artémisinine dans la solution aqueuse d'*Artemisia annua* pour la souche sensible à la chloroquine et sept fois supérieure pour la souche résistante à la chloroquine.

| Composé / Extraits | IC ₅₀ (nM) Souche HB3 | IC ₅₀ (nM) Souche Dd2 |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Chloroquine (CQ) | 21,8 ± 2,4 | 202,9 ± 10,7 |
| Artémisinine | 22,6 ± 0,7 | 21,2 ± 2,3 |
| Artésunate | 8,8 ± 0,3 | 5,6 ± 0,6 |
| Artémisitène | 88,4 ± 9,9 | 74,1 ± 7,8 |
| 9-épi-artémisinine | 59,2 ± 1,7 | 62,2 ± 1,0 |
| <i>Artemisia</i> extrait aqueux (thé) | 7,6 ± 3,4 | 2,9 ± 0,4 |

*Tableau 6 : IC₅₀ d'extraits et de composants issus d'*Artemisia annua* sur des souches sensibles (HB3) et résistantes (Dd2) à la chloroquine (Suberu et al. 2013)*

La combinaison de différentes molécules présentes chez *Artemisia annua* a été analysée dans le but de déterminer les interactions qui s'opèrent (Tableau 7, page 45).

| Combinaison | Souche HB3 (sensible à la chloroquine) | | Souche Dd2 (résistante à la chloroquine) | |
|------------------------|---|-------------|---|-------------|
| | Indice FIC | Interaction | FIC | Interaction |
| 1: 3 ART: CA | 1,570 | Antagoniste | 4.046 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: 3CA | 1,172 | Additif | 2,088 | Antagoniste |
| 1 : 10 ART: 3CA | 0,685 | Synergique | 1,087 | Additif |
| 1: 100 ART: 3CA | 0,781 | Synergique | 1,177 | Additif |
| 1: 3 ART: 4CA | 1,088 | Additif | 4.266 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: 5CA | 0,928 | Additif | 2,460 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: 34CA | 2,253 | Antagoniste | 4,862 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: 35CA | 2,312 | Antagoniste | 4.749 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: 45CA | 2,315 | Antagoniste | 4,844 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: TCA | 1.220 | Additif | 3,041 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: ISO | 1.534 | Antagoniste | 4,829 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: CAS | 1,921 | Antagoniste | 3.034 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: ATCID | 1,467 | Additif | 4.152 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: ARTB | 1.250 | Additif | 0,342 | Synergique |
| 1: 3 ART: RA | 0,890 | Synergique | 4,952 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: DHAA | 1.801 | Antagoniste | 2.861 | Antagoniste |
| 1: 3 ART: ATÈNE | 3,480 | Antagoniste | 7.002 | Antagoniste |
| ART | 1 | - | 1 | - |

Légende : ART = artémisinine, CA = acide caféique, 3CA = acide 3-caféoylquinique, 4CA = acide 4-caféoylquinique, 5CA = acide 5-caféoylquinique, 3,4 AC = acide 3,4-di-caféoylquinique, 3,5CA = 3, Acide 5-di-caféoylquinique, 4,5CA = acide 4,5-di-caféoylquinique, TCA = acide 3,4,5-tri-caféoylquinique, ISO = isovitexine, CAS = casticine, ATC = acide artémisinique, ARTB = arteannuin B , RA = acide rosmarinique, DHAA = acide dihydroartémisinique, ATENE = artémisitène

Tableau 7 : Interactions entre les différentes molécules présentes chez Artemisia annua (Suberu et al ; 2013)

Ce tableau permet de mettre en évidence les synergies existantes entre les différentes substances présentes dans *Artemisia annua* à partir de l'index FIC (Fractional inhibitory Concentration). L'index FIC est obtenu en faisant le rapport des valeurs d'IC₅₀ des composés seuls et combinés. Les FIC de chaque composé sont par la suite additionnés.

Les références des FIC sont les suivantes :

- indice FIC $< 0,9$ = synergie
- $0,9 < \text{indice FIC} < 1,5$ = additivité
- indice FIC $> 1,5$ = antagonisme

L'artémisinine et l'acide 3-caféoylquinique présentent une action synergique sur les souches de *Plasmodium* sensibles à la chloroquine. C'est aussi le cas avec l'acide rosmarinique.

Pour la souche résistante à la chloroquine, une action synergique est observée entre l'artémisinine et l'arteannuin B.

Ces résultats pourraient permettre de déterminer les molécules à associer dans le but de potentialiser l'effet anti-plasmodique de l'artémisinine mais aussi pour diminuer le risque d'apparition de résistances. En effet, plus il y aura de molécules actives avec une forte synergie, plus faible sera le risque de développement de nouvelles résistances.

V. Des plantes pour de nouveaux traitements

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la recrudescence des cas de résistance aux antipaludéens nécessite la recherche de nouvelles molécules médicamenteuses. Ces molécules peuvent être de nouvelles molécules dérivées de celles déjà utilisées dans le traitement du paludisme ou de nouvelles substances isolées de la flore naturelle sur la base de la connaissance ancestrale des tradi-thérapeutes exerçant dans des zones endémiques. La nature est riche en plantes et en molécules ayant un grand potentiel thérapeutique. Beaucoup de médicaments allopathiques modernes ont été synthétisés grâce aux connaissances des guérisseurs concernant les plantes médicinales qu'ils ont à leur disposition pour soigner la population. Un nombre considérable de publications sort chaque année en ethnopharmacologie, mais les articles présentent des différences, tant en terme de démarche que d'analyse. Afin de limiter les biais, j'ai choisi de présenter une sélection de travaux qui utilisent une démarche comparable à savoir : analyse chimique de la composition des plantes, tests *in vitro* sur des cellules infectées par une souche sensible de *Plasmodium falciparum* ou par une souche résistante ou multirésistante, enfin si possible, des tests *in vivo*.

1. Les plantes africaines utilisées en médecine traditionnelle contre le paludisme

En Afrique, lieu où le paludisme tue le plus, de nombreuses plantes sont utilisées par les tradi-thérapeutes afin de soigner au mieux les populations n'ayant pas ou difficilement accès

aux thérapies allopathiques. Les trois études décrites ci-dessous analysent quelles molécules issues de plantes africaines pourraient présenter un intérêt thérapeutique, mais le mode d'administration et de préparation en médecine traditionnelle n'est pas documenté.

La première étude est celle d'une équipe du laboratoire de pharmacologie de l'université de Liège (Belgique). Ils étudient l'effet des alcaloïdes indoliques présents chez *Strychnos sp.*, plante de la famille des Loganiacées. Trois espèces ont été analysées pour estimer leur potentielle activité sur *P. falciparum*. Il s'agit de *Strychnos icaja*, *S. usambarensis* ainsi que de *S. variabilis*.

Strychnos icaja est une plante présente sous forme de longues lianes pouvant atteindre 100 mètres de long. Elle est retrouvée principalement en Afrique centrale. De nombreuses molécules et principalement des alcaloïdes ont été extraits de ses racines et tous ont été testés *in vitro* sur des souches de *Plasmodium falciparum*. Trois groupes d'alcaloïdes ont été étudiés de manière plus précise, les sungucines qui sont des alcaloïdes bisindoliques, les strychnogucines (alcaloïdes proche de la strychnine) ainsi que les strychnohexamines de la famille des alcaloïdes trisindoliques (Figure 35)³⁵.

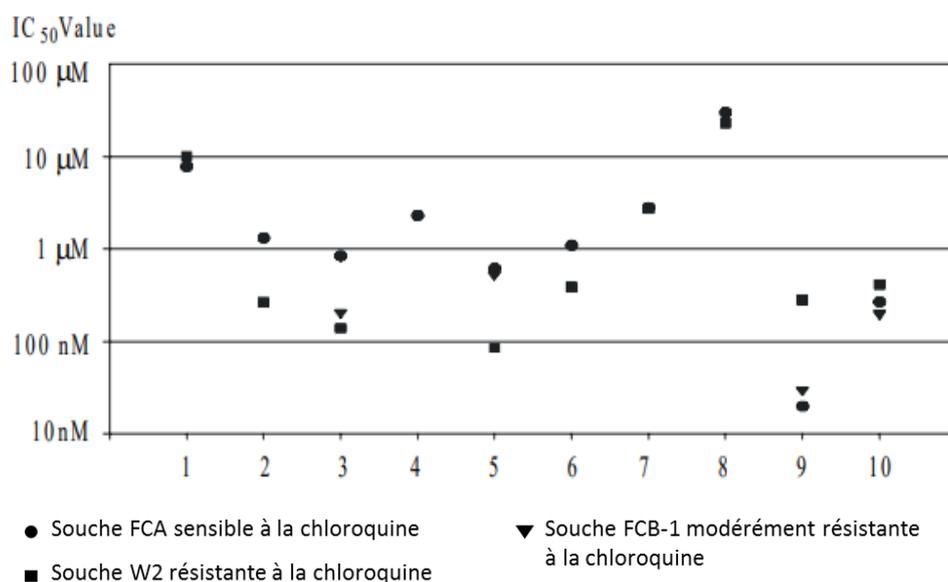


Figure 35 : IC₅₀ des principaux alcaloïdes présents chez *Strychnos icaja* ainsi que les IC₅₀ de la chloroquine et de la quinine sur différentes souches de *Plasmodium*. (Frederich et al ; 2003)

En abscisse les différents alcaloïdes testés sont numérotés de 1 à 8 et les contrôles sont respectivement la chloroquine (9) et la quinine (10)

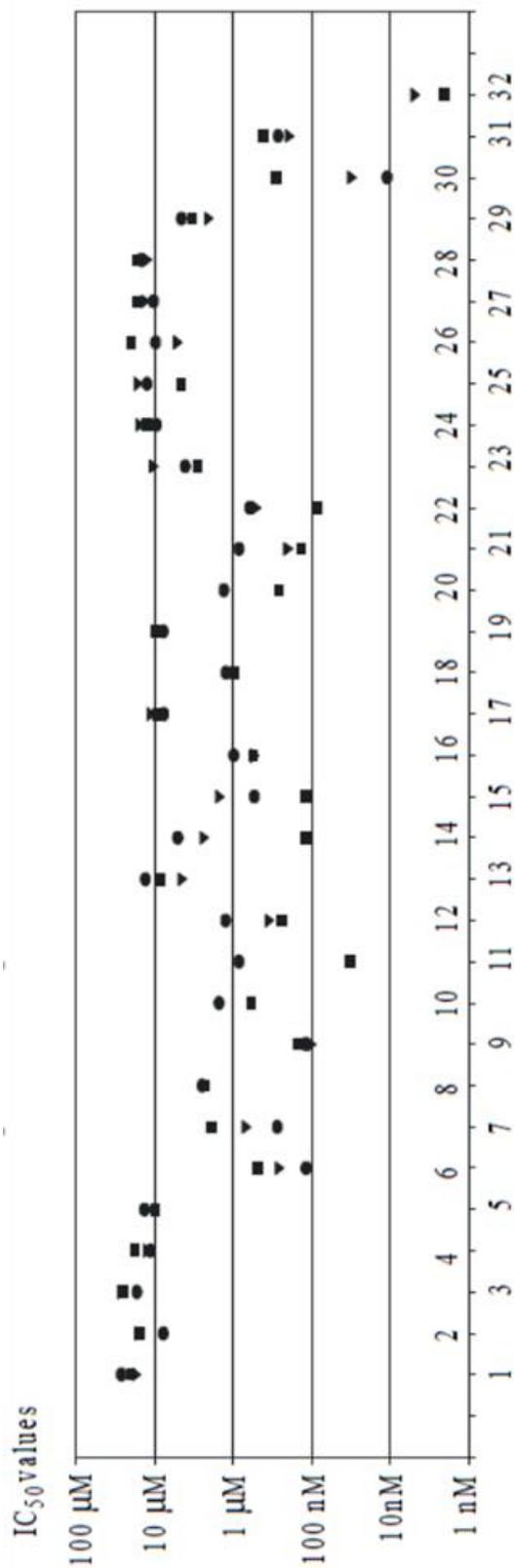
1/ Sungucine, 2/ Isosungucine, 3/ 18-hydroxyisosungucine, 4/ Strychnogucine A, 5/ Strychnogucine B, 6/ Strychnohexamine, 7/ Bisnordihydrotoxoferine, 8/ Strychnine, 9/ Chloroquine, 10/ Quinine

Parmi les alcaloïdes présents dans cette plante, il semblerait que la molécule la plus active sur *P. falciparum* soit la strychnogucine B, avec une IC₅₀ inférieure à 100nM pour la souche W2 résistante à la chloroquine.

C'est en Afrique tropicale que pousse *Strychnos usambariensis*, sous la forme d'un petit arbre. De ses racines a été extrait un alcaloïde tertiaire, la dihydrousambarensine, dont l'activité anti-plasmodiale semble être intéressante, et de ses feuilles ont été extraites la strychnopentamine et ses isomères (isostrychnopentamines), alcaloïdes dont l'activité est deux fois supérieure à celle de la quinine (Figure 36, page 49)³⁵.

Strychnos variabilis est la troisième espèce étudiée. C'est un petit arbre qui pousse notamment au Congo Kinshasa. Les extraits de racines ont permis d'isoler 21 alcaloïdes différents. Parmi eux, on trouve les strychnobilines qui font partie du groupe des alcaloïdes bisindoliques (Figure 36, page 49)³⁵.

On remarque que la majorité des molécules actives dans ces plantes sont des alcaloïdes indoliques. La structure hétérocyclique de ces molécules associant deux fonctions aminobasiques, leur lipophilie et leur taille créant un encombrement stérique, pour les alcaloïdes bis- ou tris-indoliques sembleraient nécessaires à leur activité anti-plasmodique. Ces relations structure/activité varient en fonction des molécules. Mais on verra plus loin que ce ne sont pas les seules molécules actives contre le paludisme (Figure 36, page 49).



● Souche FCA sensible à la chloroquine ▼ Souche FCB-1 modérément résistante à la chloroquine ■ Souche W2 résistante à la chloroquine

3 – akagerine lactone, 4 – demethoxycarbonyl-3,14-dihydrogambirtannine, 5 – 9-methoxy-16(R)-E-isositsirikine, 6 – ochrolifuanine A, 7 – ochrolifuanine E, 8 – usambarine (8), 9 – isostrychnopentamine (9), 10 – usambarine (6), 11 – dihydrousambarensine (7), 12 – matopense, 13 – matopense-N-oxide, 14 – 18-hydroxymatopense, 15 – 16-methoxyisomatopense, 16 – longicaudatine, 17 – longicaudatine F, 18 – tetradehydrolongicaudatine Y, 19 – sungucine (10), 20 – isosungucine (13), 21 – 18-hydroxyisosungucine, 22 – strychnogucine B (12), 23 – strychnofuranine, 24 – janussine A, 25 – janussine B, 26 – S-panganensine, 27 – panganensine Y, 28 – panganensine X, 29 – 16,17-dehydroisostrychnobiline, 30 – chloroquine, 31 – quinine, 32 – artemisinin.

Figure 36 : IC₅₀ de plusieurs alcaloïdes indoliques retrouvés dans *Strychnos* sp. Sur trois souches différentes de *Plasmodium falciparum* et IC₅₀ de la chloroquine, de la quinine et de l'artémisinine sur ces mêmes souches (Frederich et al. ; 2003)

Une autre étude, plus récente, a étudié l'effet antipaludéen *in vitro* d'extraits méthanoliques et de dichlorométhane de *Dichrostachys cinerea* et de *Commiphora africana*, deux plantes utilisées par les Masai en Tanzanie. Ces essais ont été réalisés sur deux souches différentes de *Plasmodium falciparum*, l'une sensible à la chloroquine (D6) et l'autre résistante (Dd2).

Des globules rouges parasités sont utilisés comme contrôle négatif et des globules rouges parasités mis en contact avec de la chloroquine sont utilisés comme contrôle positif. Les cellules parasitées sont mises en contact avec différents extraits de ces plantes. Après 48 heures d'incubation, un test à la lactate déshydrogénase (LDH) permet de détecter l'activité de l'enzyme qui est directement liée à la parasitémie. Ce test consiste en la détection, par immunochromatographie à l'aide d'anticorps monoclonaux, de la lactate déshydrogénase présente chez le parasite et qui existe sous différents isotypes spécifiques à l'espèce de *Plasmodium*. Cette enzyme n'est présente que chez le parasite viable ce qui permet donc d'estimer l'activité de celui-ci.

Dans les extraits méthanoliques, plusieurs substances chimiques sont retrouvées dont des glycosides, des flavonoïdes, des tanins, des terpénoïdes³⁶... Il n'y a que dans les extraits de *Commiphora africana* que des alcaloïdes ont été mis en évidence.

Huit extraits différents ont été testés (Tableau 8, page 51).

| Extraits | IC ₅₀ (souche D6) (µg/mL) | IC ₅₀ (souche Dd2) (µg/mL) | CC ₅₀ (cellules LLC-MK2) (µg/mL) |
|---------------------------------------|---|--|---|
| CAB (Dichlorométhane) | 4.54 | > 1000 | > 1000 |
| CAS (Dichlorométhane) | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| CAB (Méthanol) | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| CAS (Méthanol) | > 1000 | > 1000 | 74.56 |
| DCB (Dichlorométhane) | 2.37 | 11.92 | 34.65 |
| DCS (Dichlorométhane) | 11.47 | > 1000 | 29.44 |
| DCB (Méthanol) | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| DCS (Méthanol) | 2.96 | > 1000 | 178.35 |
| Contrôle Chloroquine | 0.05 | 0.06 | |
| Contrôle Triton-X100 | | | 2.44 |

Tableau 8 : IC₅₀ et CC₅₀ des différents extraits de plantes, d'après Kweyamba et al ; 2019

CAS: *Commiphora africana* (tiges entières); CAB: *Commiphora africana* (écorce de tige) ; DCS: *Dichrostachys cinerea* (tiges entières) ; DCB: *Dichrostachys cinerea* (écorce de tige); ND: non déterminé. Le contrôle positif de l'IC₅₀ correspond à un traitement à la chloroquine et le contrôle positif de la cytotoxicité est obtenu en traitant les cellules avec un détergent non ionique, le Triton-X100. En orange, les extraits présentant des caractéristiques antipaludéennes notables.

Dans le tableau, sont indiquées les CC₅₀ (concentration cytotoxique 50%) permettant d'estimer la potentielle toxicité des extraits sur des cellules LLC-MK2 (cellules épithéliales de rein de singe). Une CC₅₀ de 30µg/mL correspond à la limite à partir de laquelle on peut considérer que l'extrait n'est pas cytotoxique.

Quatre extraits ont une activité antipaludique sur les souches D6, il s'agit des extraits de dichlorométhane des écorces de tiges de *C. africana* (IC₅₀ = 4,54 µg/mL), d'écorce de tiges (IC₅₀ = 2,37 µg/mL) et de tige entière (IC₅₀ = 11,47 µg/mL) de *D. cinerea* ainsi que de l'extrait méthanolique de *D. cinerea* (IC₅₀ = 2,96 µg/mL)³⁶.

Sur la souche Dd2, un seul extrait semble avoir un effet contre *Plasmodium falciparum*, il s'agit de l'extrait de dichlorométhane de l'écorce de tige de *D. cinerea* pour laquelle l'IC₅₀ est de 11,92 µg/mL (Tableau 8)³⁶.

L'étude d'extraits de plantes dont l'IC₅₀ est inférieure à 15µg/mL est une première phase indispensable au développement de nouveaux traitements contre le paludisme.

Des essais *in vivo* ont donc été réalisés sur des souris infectées par *Plasmodium berghei*. Pour cela, le parasite a été inoculé aux souris à J0 puis de J1 à J5, chaque extrait a été donné respectivement à un groupe de souris à la dose de 400 mg/kg par voie orale. Le groupe témoin positif a été traité par de la quinine (10mg/kg par voie orale) et le groupe témoin négatif a reçu 100µL d'une solution saline tamponnée au phosphate tous les jours. Pendant 28 jours après l'inoculation du parasite, les différents groupes ont été surveillés. La parasitémie a été mesurée à J5 en réalisant des frottis sanguins permettant ainsi d'estimer le taux de suppression du parasite (Tableau 9).

| Traitement | Taux de suppression des parasites (%) | Changement de poids corporel (initial – final en grammes) | Jours de survie moyens |
|--|---------------------------------------|---|------------------------|
| PBS (contrôle négatif) | 0,00 | - 17,9% (23,5 ± 1,1–19,3,0 ± 1,4) | 12,2 ± 2,5 |
| Ecorce de tige de <i>C. africana</i> (Dichlorométhane) | 64,24 | 5,8% (22,4 ± 0,6-23,7 ± 1,2) | 23,0 ± 3,5 |
| Ecorce de tige de <i>D. cinerea</i> (Dichlorométhane) | 53,12 | 3,9% (22,1 ± 1,0–22,9 ± 1,1) | 22,3 ± 3,05 |
| Quinine (contrôle positif) | 96,02 | 7,2% (20,8 ± 1,5 à 22,3 ± 1,0) | 28,0 ± 0,0 |

Tableau 9 : Clairance parasitaire, variations de poids et survie des différents groupes de souris traités par deux extraits de dichlorométhane de plantes (Kweyamba et al ; 2019)

PBS : Phosphate buffer saline

Les deux extraits de dichlorométhane ayant la plus forte affinité *in vitro* contre *P. falciparum* ont été testés. Le taux de suppression du parasite reste beaucoup plus faible avec les extraits qu'avec la quinine mais l'activité reste bien présente et plus de la moitié des parasites ont été supprimés. De plus, au cours du traitement, les souris montrent un accroissement pondéral régulier alors que les souris traitées au PBS perdent du poids. De même, l'espérance de vie au cours de l'essai est plus élevée chez les souris traitées que chez les souris contrôle. Ces deux extraits de plantes présentent une grande concentration de flavonoïdes et de saponines qui possèdent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires respectivement³⁶. Cette étude montre que l'extrait de dichlorométhane d'écorce de tige de *D. cinerea*, actif sur les souches sensibles et résistantes à la chloroquine sans toxicité majeure, pourrait être une piste potentielle de développement d'un nouveau traitement.

Concernant les extraits de *C. africana*, seul l'extrait au dichlorométhane montre une IC₅₀ de 4,54µg/mL sur la souche D6 mais n'est pas efficace sur la souche Dd2 résistante à la chloroquine.

Cette publication est importante car elle montre que les alcaloïdes sont loin d'être les seules molécules à activité antipaludique, *D. cinerea* qui semble dans ces expériences plus efficace que *C. africana* n'en contient pas. Des études supplémentaires pourraient être envisagées afin de préciser les effets respectifs de *C. africana* et de *D. cinerea*.

On peut compléter cette partie avec les résultats d'une troisième étude réalisée avec des extraits de *Balanites rotundifolia*, une plante utilisée en Ethiopie dans le traitement du paludisme³⁷. Ce sont les parties aériennes de cette plante qui ont été utilisées dans cet essai, récoltées, séchées lentement à l'ombre puis réduites en poudre. Cette poudre a ensuite été mise en solution méthanolique afin d'en extraire certains composés dont des terpénoïdes, des tanins, des flavonoïdes ou encore des alcaloïdes³⁷.

Une souche de *Plasmodium berghei* sensible à la chloroquine a été inoculée à cinq groupes de souris. Trois groupes ont reçu respectivement 100mg/kg (BR100), 200mg/kg (BR200) ou 400mg/kg (BR400mg) d'extraits de *B. rotundifolia*, un quatrième a reçu 25mg/kg de chloroquine (CQ25) correspondant au contrôle positif et le dernier une solution à 2% de Tween 80 (tensioactif) comme contrôle négatif (NC). L'administration est faite selon deux protocoles, tout d'abord un test suppressif de 4 jours au cours duquel on administre par voie orale les différents extraits deux heures après l'inoculation du parasite puis tous les jours pendant 4 jours. Le second protocole est le test de Rane consistant en l'administration de ces mêmes composés 72 heures après l'inoculation du parasite afin de laisser proliférer ce dernier. A J4 pour le premier test et à J8 pour le second, des frottis sanguins sont réalisés afin d'estimer la parasitémie des souris.

Test de suppression de 4 jours

Tous les extraits de *B. rotundifolia* ont montré une diminution significative de la parasitémie, et cet effet augmente avec la dose (Tableau 10, page 54). Une baisse du poids corporel des souris non significatif est observé dans les trois groupes BR mais il est moindre dans le groupe BR400 (Tableau 11, page 54).

| Groupes | % taux de suppression des parasites | Nombre de jours de survie |
|---------|-------------------------------------|---------------------------|
| NC | 0 | 7,71 |
| BR100 | 36,5 (p<0,05) | 10,71 |
| BR200 | 42,1 (p<0,01) | 10,71 |
| BR400 | 66,9 (p<0,001) | 17,29 |
| CQ25 | 100 | 20,00 |

Tableau 10 : Pourcentage de suppression parasitaire et nombre de jours de survie des différentes concentrations de B. rotundifolia, d'après Asrade et al ; 2017

| Dose, mg/kg | BWt D0 | BWt D4 | % change |
|-------------|------------|------------|------------------------------|
| NC | 31.79±0.69 | 29.47±0.50 | -7.3±1.717 |
| BR100 | 33.57±1.33 | 29.51±1.22 | -12.1±2.474 |
| BR200 | 28.46±1.36 | 24.94±1.23 | -12.4±1.476 |
| BR400 | 34.04±0.72 | 31.57±1.18 | -7.3±2.262 |
| CQ25 | 28.47±1.41 | 29.54±1.31 | 3.8±0.86 ^{a2b3c2d3} |

Tableau 11 : Variations du poids moyen (en grammes) des différents groupes de souris en fonction des extraits utilisés (Asrade et al ; 2017)

BWt D0 : Poids moyen à J0 (en grammes) ; BWt D4 : Poids moyen à J4 (en grammes)

Test de Rane

Le pourcentage d'inhibition du parasite par les extraits de la plante est similaire à celui du test de suppression de 4 jours et reste donc significatif par rapport au groupe non traité. Comme précédemment il est significativement inférieur au groupe traité par chloroquine. La durée moyenne de survie des souris est, quant à elle, inférieure de trois jours environ pour chacun des groupes traités par rapport au test précédent (Tableau 12, page 55).

| Groupes | % taux de suppression des parasites | Nombre de jours de survie |
|---------|-------------------------------------|---------------------------|
| NC | 0 | 7,67 |
| BR100 | 37,73 | 8,16 |
| BR200 | 45,35 | 8,67 |
| BR400 | 65,84 | 14,00 |
| CQ25 | 93,65 | 20,00 |

Tableau 12 : Pourcentage de suppression parasitaire et nombre de jours de survie des différentes concentrations de B. rotundifolia, d'après Asrade et al ; 2017

Concernant le poids, les différences observées ne sont pas significatives (Tableau 13).

| Group | Body weight | | |
|-------|-------------|------------|--------------|
| | BWt D4 | BWt D7 | % change BWt |
| NC | 31.18±1.07 | 30.95±0.86 | -0.74±3.73 |
| BR100 | 33.51±0.35 | 31.55±0.86 | -5.85±2.30 |
| BR200 | 32.01±1.62 | 32.33±1.87 | 0.10±1.21 |
| BR400 | 31.82±1.31 | 32.86±1.23 | 3.27±1.98 |
| CQ25 | 37.91±1.01 | 38.63±1.34 | 1.90±3.37 |

Tableau 13 : Variations du poids moyen (en grammes) des différents groupes de souris en fonction des extraits utilisés d'après Asrade et al ; 2017

BWt D4 : Poids moyen à J4 (en grammes) ; BWt D7 : Poids moyen à J7 (en grammes)

Cette étude permet de mettre en évidence à travers deux tests différents, les effets préventifs et curatifs d'extraits méthanoliques de *B. rotundifolia*. Cet extrait montre une parasitémie réduite de plus de 50% pour une dose de 400mg/kg par jour ce qui reste un effet antipaludique modéré *in vivo*. Les auteurs considèrent que ces effets sont essentiellement dus aux alcaloïdes présents dans la plante.

2. Les plantes asiatiques utilisées en médecine traditionnelle contre le paludisme

Après la découverte de l'artémisinine issue d'*Artemisia annua*, d'autres essais ont été réalisés sur des plantes asiatiques à partir de la bibliothèque de produits naturels utilisés en médecine traditionnelle chinoise de l'université de Toyama au Japon. L'équipe de recherche de Kentaro Kato a tenté d'identifier des composés ayant potentiellement des effets antipaludéens³⁸. Trois tests ont été réalisés sur ces composés :

- un test d'inhibition de croissance sur des érythrocytes humains en culture à 0,3% de parasitémie afin de déterminer la concentration inhibant 50% des parasites (IC₅₀)
- un test de cytotoxicité sur la lignée de cellules rénales HEK293 T, qui permet de déterminer la toxicité de la molécule sur les cellules humaines,
- enfin un test d'inhibition de croissance spécifique qui déterminera le stade de développement du parasite sur lequel agit le principe actif.

Le test d'inhibition de croissance a été conduit sur des érythrocytes humains infectés avec une souche de *Plasmodium falciparum* sensible à la chloroquine (Souche 3D7) à partir de 96 composés naturels. Ces composés ont été testés et leur effet a été évalué après 96 heures (Figure 37). Les composés naturels ont été solubilisés dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) à 0,1% et utilisés à des concentrations de 10µM. Le contrôle négatif correspond à du DMSO 0,1% pour lequel il y a 0% d'inhibition du parasite et le contrôle positif est la pyriméthamine (anti-protozoaire) dosée à 10µM qui inhibe à près de 100% la souche 3D7, sensible à la chloroquine.

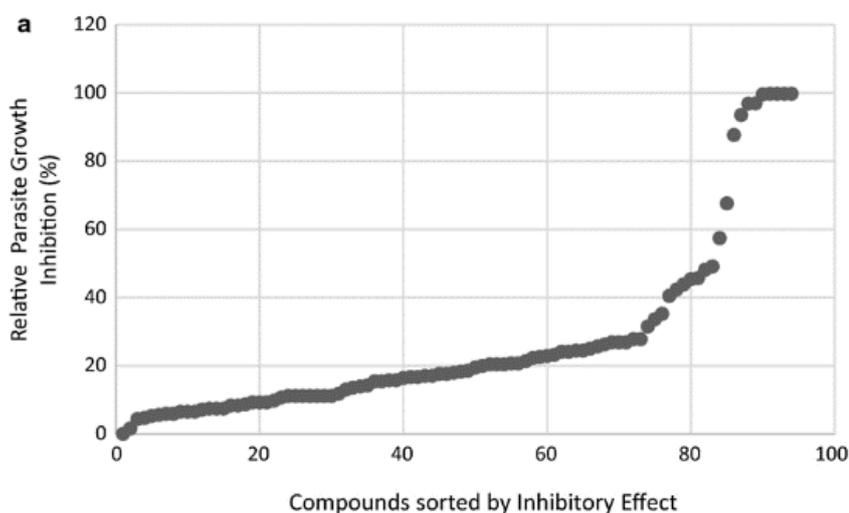


Figure 37 : Evaluation de l'inhibition de croissance relative (% du contrôle) à 96 h pour chacune des 96 substances naturelles. Les essais sont réalisés sur des globules rouges humains infectés par la souche 3D7 de Plasmodium falciparum résistante à la chloroquine. Le contrôle négatif correspond à du DMSO 0,1% seul, le contrôle positif à de la pyriméthamine 10µM (Nonaka et al ;2018)

Parmi ces 96 composés naturels, quatre d'entre eux présentaient un pourcentage d'inhibition de plus de 99% sans activité hémolytique associée. Ces quatre molécules font partie ou ont une structure similaire aux alcaloïdes isoquinoléiques. Leurs noms et les valeurs d'IC₅₀ sont indiqués ci-dessous (Tableau 14, page 57)

| Composés | Taux d'inhibition de croissance | IC ₅₀ (nM) |
|---|---------------------------------|-----------------------|
| Chlorure de palatin | 99,5% | 26 |
| Chlorure de berbérine | 99,7% | 36 |
| Chlorure de Coptisine (<i>Coptis chinensis</i>) | 99,7% | 35 |
| Nitrate de déshydrocorydaline | 99,7% | |

Tableau 14 : Taux d'inhibition de croissance et IC₅₀ des différentes substances testées sur la souche 3D7 de *P. falciparum* (Nonaka et al ; 2018)

Afin de déterminer la concentration inhibant le plus efficacement la croissance du parasite, des globules rouges infectés par la souche 3D7 de *P. falciparum* ont été incubés pendant 4 jours avec des concentrations croissantes de (10nM - 10µM) de chaque composé. Les résultats sont présentés dans la figure 38.

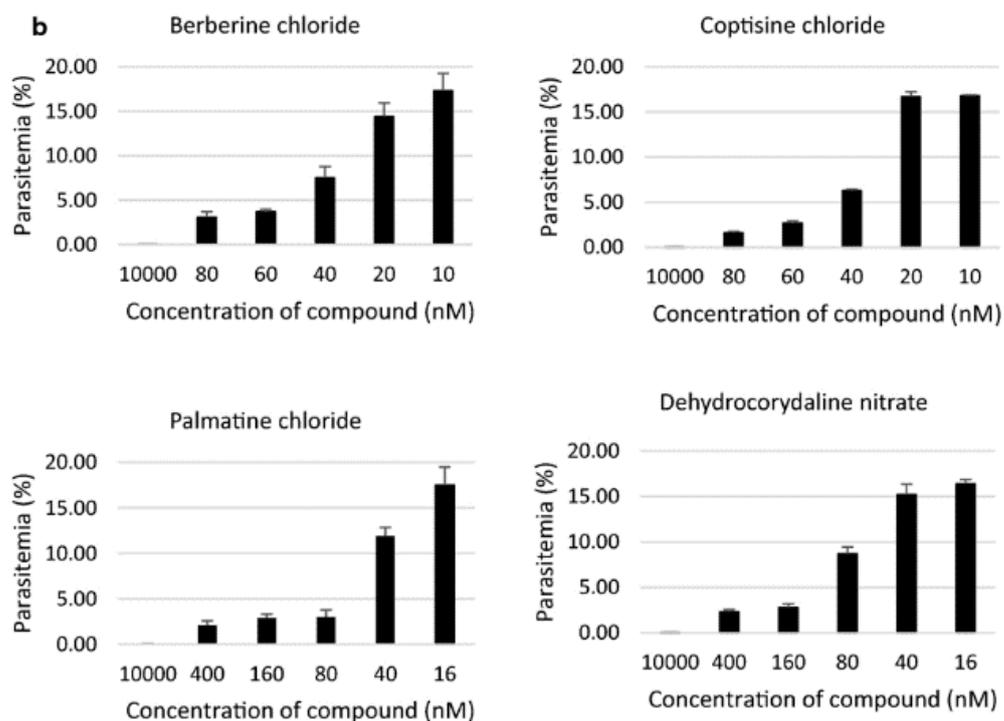


Figure 38 : Effet dose-dépendant des composés sur le pourcentage de parasitémie à 4 jours, pour la souche 3D7 (Nonaka et al ; 2018)

Il apparaît que pour les concentrations de l'ordre de 10µM, la parasitémie tend vers 0% au bout de 4 jours d'incubation quelle que soit la molécule. On observe par ailleurs que l'effet inhibiteur est dose-dépendant.

Les molécules ayant montré des effets sur la souche 3D7, ont par la suite été testées sur une souche de *Plasmodium falciparum* multi-résistante, la souche D2d. Pour les tests d'inhibition de croissance, de l'artésunate 10 μ M a été utilisé comme contrôle positif d'inhibition du fait de son activité sur cette souche. Les IC₅₀ obtenues sont présentées ci-dessous (Tableau 15 et Figure 39, page 59).

| Composé | Taux d'inhibition de croissance | IC₅₀ (nM) |
|--------------------------------------|--|-----------------------------|
| Chlorure de berbérine | 100% | 54 |
| Chlorure de palmatine | 100% | 81 |
| Nitrate de déshydrocorydaline | 94,5% | 161 |
| Chlorure de Coptisine | 93,5% | 190 |

Tableau 15 : Taux d'inhibition de croissance et IC₅₀ des différentes substances testées sur les souches D2d de P. falciparum (Nonaka et al ; 2018)

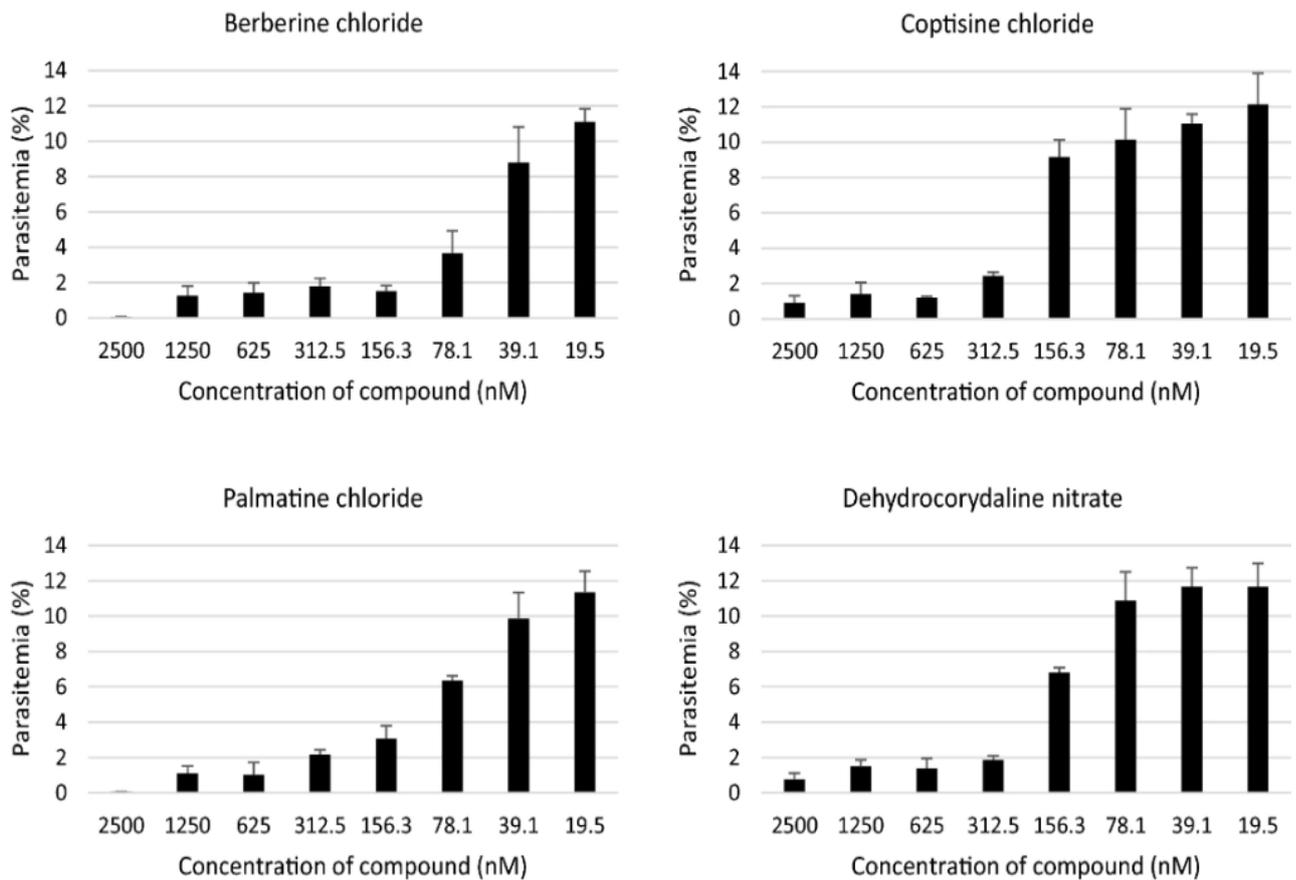


Figure 39 : Effet dose-dépendant des composés sur le pourcentage de parasitémie à 4 jours de la souche D2d (Nonaka et al ; 2018)

L'étude de cytotoxicité a été effectuée sur la lignée cellulaire HEK293 T incubée pendant 96 heures avec différentes concentrations des quatre composés à tester. On remarque une bonne viabilité cellulaire pour des concentrations inférieures à 1 μ M, ce qui permet une bonne action antiparasitaire sans altération majeure de la viabilité des cellules saines (Figure 40, page 60).

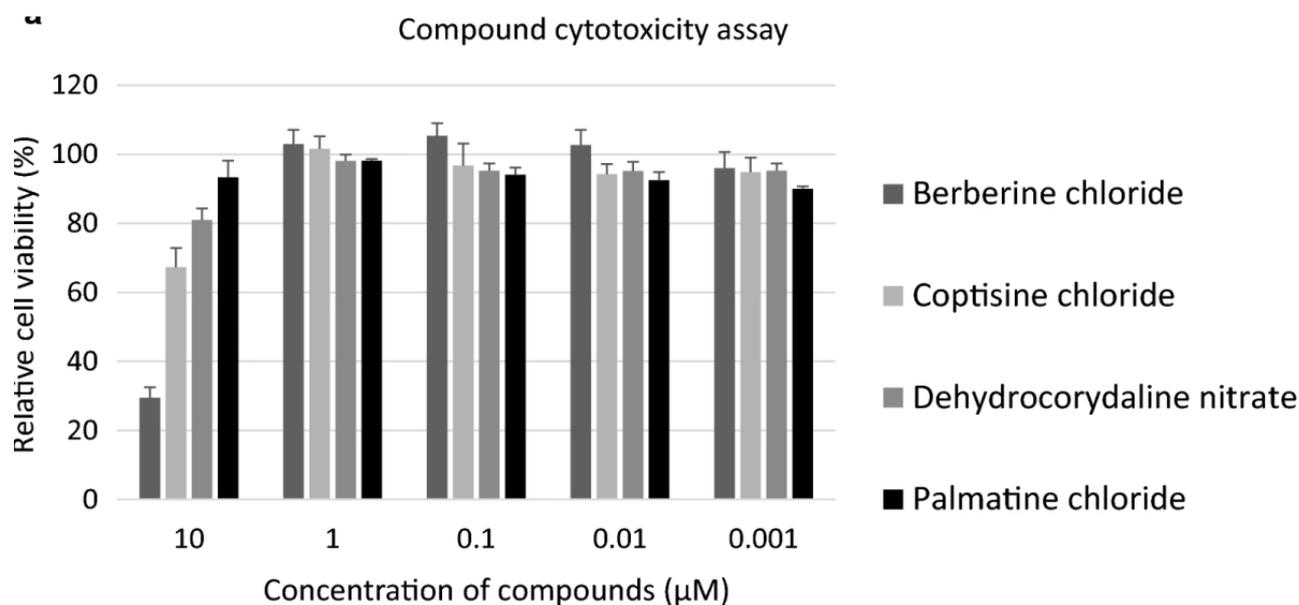


Figure 40 : Survie des cellules de la lignée 293T en fonction de différentes concentration de chacune des substances extraites (Nonaka et al ; 2018)

Par la suite, les stades au cours desquels les molécules sont les plus actives ont été déterminés pour la souche 3D7 de *Plasmodium falciparum* après deux étapes de synchronisation de la culture cellulaire par du sorbitol à 5%. La première synchronisation permet d'obtenir des cellules infectées par des parasites jeunes au stade anneau uniquement, la seconde 36h après permet d'atteindre le stade trophozoïte, enfin après 24 heures supplémentaires les parasites intracellulaires atteignent le stade de schizontes matures.

Tous les extraits sont donc testés sur les différents stades de parasites.

Les témoins négatifs et positifs sont respectivement le DMSO à 0,1% et la pyriméthamine à 10μM. On observe après 48h d'incubation que le chlorure de berbérine, le nitrate de déshydrocorydaline et le chlorure de palmatine sont majoritairement efficaces sur les stades trophozoïtes et schizontes. Concernant le chlorure de copsisine, on remarque une action sur ces deux mêmes stades mais tout de même moins prononcée qu'avec les trois premiers composés (Figure 41, page 61).

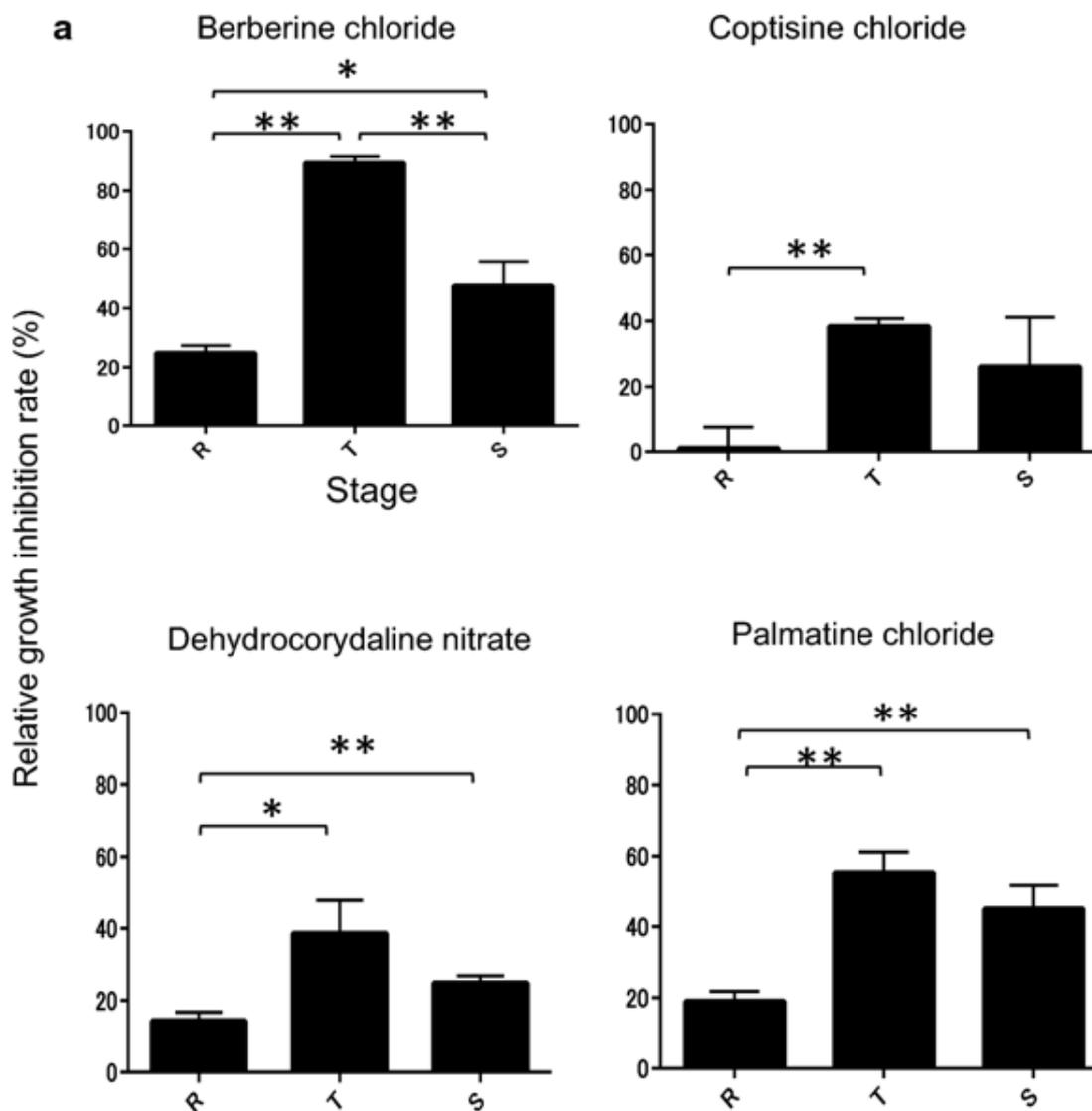


Figure 41 : Pourcentage d'inhibition de P. falciparum par les différentes substances testées en fonction du stade de développement du parasite

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; R (stade anneau), T (stade trophozoïte), S (stade schizontes)

Ces quatre composés issus de la bibliothèque des produits naturels ont donc une activité antipaludéenne indéniable et une très faible toxicité pour des concentrations inférieures à $1\mu\text{M}$.

Dans une autre étude réalisée par Haddad et al, des plantes fraîches utilisées pour traiter les pathologies fébriles, inflammatoires et infectieuses ont été récoltées dans différentes régions d'Iran puis séchées et broyées pour être conservées dans des conditions optimales³⁹. Leurs noms et les parties de plantes utilisées au cours de l'essai sont indiqués dans le tableau 16 (p. 62).

| Espèces | Famille | Partie utilisée |
|-------------------------------|---------------|--------------------|
| <i>Solanum nigrum</i> | Solanaceae | Fruits |
| <i>Teucrium polium</i> | Lamiaceae | Parties aériennes |
| <i>Physalis alkekengi</i> | Solanaceae | Feuilles et Fruits |
| <i>Citrullus colocynthis</i> | Cucurbitaceae | Fruits |
| <i>Salix alba</i> | Salicaceae | Feuilles |
| <i>Achillea millefolium</i> | Compositae | Fleurs |
| <i>Gossypium herbacum</i> | Malvaceae | Feuilles |
| <i>Verbena officinalis</i> | Verbenaceae | Fleurs |
| <i>Portulaca oleracea</i> | Portulacaceae | Parties aériennes |
| <i>Lavandula angustifolia</i> | Lamiaceae | Fleurs |

Tableau 16.: Plantes iraniennes testées *in vitro* sur deux souches de *P. falciparum*, d'après Haddad et al ; 2017

Des extraits méthanoliques de ces plantes ont ensuite été testés *in vitro* sur les souches 3D7 (sensible à la chloroquine) et K1 (souche multirésistante) de *Plasmodium falciparum*.

Parmi ces plantes, il a été mis en évidence une activité antiplasmodique intéressante des extraits méthanoliques de *Citrullus colocynthis* (IC₅₀ = 2,01 µg/mL sur la souche 3D7 et IC₅₀ = 6,9 µg/mL sur la souche K1)³⁹.

D'autres extraits ont montré des activités plus modérées. Il s'agit de *Solanum nigrum* pour laquelle l'IC₅₀ est de 10,29 µg/mL sur la souche 3D7 et de 18,67 µg/mL sur la souche K1 et *Physalis alkekengi* dont l'IC₅₀ est de 11,31 µg/mL sur la souche 3D7 et de 13,08 µg/mL sur la souche multirésistante³⁹.

Ces 3 extraits ont été testés *in vivo* sur des souris infectées par *Plasmodium berghei*.

Le pourcentage d'inhibition des différents extraits sur *P. berghei* a été calculé comme suit :

$$100 - \left(\frac{\text{parasitémie moyenne}}{\text{Parasitémie moyenne du contrôle négatif}} \right) \times 100$$

| Espèce | Dose (mg / kg) | Parasitémie moyenne | Pourcentage d'inhibition (%) | Survie (%) au jour 10 | Valeur <i>P</i> (<i>P</i> <0,05) |
|------------------------------|----------------|---------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Contrôle négatif | | 2,95 | | 100 | |
| <i>Solanum nigrum</i> | 100 | 1,16 | 60,68 | 100 | 0,014 |
| <i>Physalis alkekengi</i> | 100 | 1,24 | 57,97 | 100 | 0,032 |
| <i>Citrullus colocynthis</i> | 50 | 1,03 | 65,08 | 90 | 0,008 |
| Chloroquine | 25 | 0 | | 100 | |

Tableau 17 : Parasitémie moyenne, pourcentage d'inhibition et pourcentage de survie des souris traitées par trois extraits de plantes d'après Haddad et al ; 2017

Le contrôle négatif correspond à des souris à qui le parasite a été inoculé mais qui n'ont reçu aucun extrait méthanolique de plante et le contrôle positif correspond, lui, à des souris parasitées traitées par chloroquine à 25mg/kg.

On remarque que ce pourcentage d'inhibition varie entre 57,97 et 65,08 % et que le résultat est significatif pour les 3 espèces testées. De plus, la survie chez les souris à 10 jours est de 100%, à l'exception du traitement par *Citrullus colocynthis*, or les souris infectées non traitées meurent rapidement dans les 3-5 premiers jours (Tableau 17)⁴⁰.

D'après cet article, deux plantes sont particulièrement intéressantes, il s'agit de *Solanum nigrum* et *Physalis alkekengi* qui semblent avoir *in vivo* une bonne activité contre *P. berghei* et n'entraînent apparemment pas de mortalité chez les souris testées (Tableau 18, page 64).

Un test cytotoxique a été réalisé *in vitro* sur des lignées cellulaire Raji (lymphocytes B), par dosage colorimétrique (Test MTT). Le sel de tétrazolium est mis en contact avec les cellules traitées par les différents extraits. Chez les cellules vivantes, la succinate déshydrogénase mitochondriale transforme le sel de tétrazolium en formazan qui donne un précipité bleu-violet. La quantification des cellules vivantes se fait par la suite grâce à la mesure de la densité optique du précipité⁴¹.

Pour ce test, le témoin négatif correspondait à des lignées qui n'avaient pas été mises en contact avec des extraits méthanoliques de plantes et le témoin positif à des cellules en contact avec du tamoxifène (anticancéreux). On considère que la toxicité cellulaire est élevée si CC₅₀ est <1µg/mL, modérée entre 1 et 10µg/mL et faible lorsqu'elle est entre 10 et 30µg/mL³⁹.

| Espèces | CC ₅₀ sur lignée cellulaire de Raji (µg/mL) |
|------------------------------|--|
| <i>Solanum nigrum</i> | 66,3 |
| <i>Physalis alkekengi</i> | 47,3 |
| <i>Citrullus colocynthis</i> | 38,7 |

Tableau 18 : CC₅₀ des trois extraits sur la lignée cellulaire Raji (Haddad et al, 2017)

Des essais ont également été réalisés au Pakistan sur les 33 plantes majoritairement utilisées pour traiter le paludisme. Parmi les cas recensés dans ce pays 64% sont causés par *Plasmodium vivax* et 36% par *Plasmodium falciparum*.

Les familles les plus représentées et donc utilisées dans le traitement sont :

- Asteraceae (9 plantes)
- Gentianaceae (3 plantes)
- Lamiaceae (3 plantes)
- Asclepiadaceae (3 plantes)

Seulement quatre plantes parmi les 33 ont été étudiées pour leur activité *in vitro* contre *P. falciparum*. Il s'agit d'*Artemisia annua* (feuilles, extrait aqueux), d'*Azadirachta indica* (feuilles, extrait éthanolique), de *Moringa oleifera* (feuilles, extrait acétonique) et de *Peganum harmala* (graines, extrait éthanolique)

Le pourcentage d'inhibition a été étudié en fonction de la concentration des extraits. Pour *Peganum harmala* et *Azadirachta indica*, un fort pourcentage d'inhibition de *Plasmodium falciparum* a été relevé allant de 50 à 99,8% pour des concentrations de 2,4 à 100µg/mL. Les extraits d'*Artemisia annua* montrent un pourcentage d'inhibition de 50% pour une concentration de 0,95µg/mL et les extraits de *Moringa oleifera* offrent un pourcentage maximal d'inhibition (59,8%) pour une concentration de 400µg/mL (Tableau 19, page 65)⁴². A nouveau, alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, tanins et terpénoïdes sont retrouvés dans ces plantes et procureraient cet effet antiparasitaire (Tableau 19, page 65).

| Nom de la plante | Partie utilisée | Substance | Extrait | Concentration (µg/mL) | Inhibition (%) |
|---------------------------|-----------------|--|---------|-----------------------|----------------|
| <i>Artemisia annua</i> | Feuilles | Artémisinine | Aqueux | 0,095 | 50 |
| <i>Azadirachta indica</i> | Feuilles | Limonioïde (Gédunine) | Ethanol | 2,4 | 50 |
| | | | | 2,5 | 50 |
| <i>Moringa oleifera</i> | Feuilles | Données non disponibles | Acétone | 400 | 59,8 |
| <i>Peganum harmala</i> | Graines | Alcaloïde β-carboline (isoharmine), harmaline, harmine | Ethanol | 12,5 | 91 |
| | | | | 25 | 97,4 |
| | | | | 50 | 98,5 |
| | | | | 100 | 99,8 |

Tableau 19 : Analyse in vitro du pourcentage d'inhibition des plantes utilisées contre Plasmodium falciparum en fonction de leur concentration et composés principaux de celles-ci (Tariq et al, 2016)

Cet essai permet simplement de montrer que de nombreuses plantes au Pakistan peuvent être source de substances à forte activité antipaludéenne et pourrait orienter la recherche vers des substances potentiellement actives. Cependant, aucun test de toxicité n'a été réalisé. Dans des études à venir, il serait intéressant de tester ces différents extraits de plantes ou substances extraites de ces plantes sur des lignées cellulaires ou *in vivo* afin de déterminer leur seuil de toxicité.

Discussion

L'Homme a toujours utilisé les ressources de son environnement pour se nourrir et se soigner. Cependant, dans les pays industrialisés, des solutions thérapeutiques obtenues par chimie de synthèse, ont progressivement pris le pas sur les traitements naturels, même si la majorité des médicaments actuels provient de la modification de substances naturelles. Dans le même temps, les pays peu développés ou en cours de développement, n'ayant que difficilement accès aux traitements modernes, ont continué d'utiliser la tradithérapie.

Or, nous assistons aujourd'hui, dans les pays riches, à un changement de paradigme avec le retour sur le devant de la scène de la médecine « naturelle ». Cette tendance est massive et le pharmacien se doit d'y répondre en s'appuyant sur ses compétences et ses connaissances en phytothérapie acquises au cours de sa formation, car l'utilisation de produits naturels n'est pas forcément un gage de sécurité en termes de santé. L'utilisation des plantes sous formes séchées, en décoctions ou encore sous forme d'huiles essentielles donne généralement de très bons résultats en médecine, mais une mauvaise utilisation (surdosage, non-respect des contre-indications...) peut aussi causer de graves conséquences sur la santé.

L'objet de ce travail a été d'analyser si et de quelle manière, des substances naturelles issues de plantes pourraient être aujourd'hui avantageusement utilisées dans la lutte contre le paludisme, tout en posant la question des limites d'utilisation de ces substances et du rôle du pharmacien dans le contrôle et le suivi de cette démarche.

Le paludisme est l'infection parasitaire la plus meurtrière au monde avec environ 500.000 morts par an, en majorité des personnes fragiles telles que les femmes enceintes, les jeunes enfants ainsi que les personnes immunodéprimées, ceci principalement dans les régions pauvres d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie. Presque une personne sur deux dans le monde y est exposée et la principale espèce meurtrière est le *Plasmodium falciparum*.

Aujourd'hui, le traitement curatif de référence des infections à *P. falciparum* repose sur l'utilisation d'ACTs composés de dérivés de l'artémisinine issue de la plante d'*Artemisia annua*. Les premiers traitements tels que la quinine ou la chloroquine ne sont aujourd'hui utilisés qu'en alternative aux ACTs dans le traitement des infections à *P. falciparum* en raison des résistances qui sont apparues chez le parasite.

Le problème majeur de santé publique posé par *P. falciparum* tient précisément à sa grande plasticité qui s'exprime dans sa capacité à accumuler des mutations lui permettant d'échapper aux thérapies tout en continuant à se développer. De nombreuses études ont été menées dans le but de caractériser les mécanismes moléculaires responsables de ces résistances afin de tenter de les contourner. Toutes les analyses montrent que les résistances sont causées par des mutations ponctuelles sur l'ADN entraînant un changement d'acide aminé (mutation faux-sens) dans les protéines codées par les gènes mutés. Ces mutations altèrent soit le fonctionnement de voies de signalisation (mutation du gène Kelch 13 et voie PI3kinase) soit les mécanismes cellulaires d'élimination de substances xénobiotiques (mutation de gènes des transporteurs ABC). Dans tous les cas il s'agit de mutations qui induisent un «gain de fonction» : en augmentant la survie cellulaire pour le gène Kelch 13, ou en augmentant l'efflux de la substance médicamenteuse hors de son site d'action pour les mutations qui concernent les gènes codant les récepteurs ABC.

Ces mutations présentent une grande diversité tant dans leur nature que dans les domaines protéiques altérés, apparaissent différentes selon les régions géographiques, surviennent fréquemment et rapidement après certains traitements. Ceci rend donc difficile d'envisager une action directe pour réduire leur incidence. Il convient donc de rechercher de nouvelles solutions thérapeutiques, associant l'effet antipaludéen de l'artémisinine et ses dérivés à l'activité d'autres molécules présentant une action synergique ou complémentaire et diminuant ainsi le risque d'apparition de nouvelles résistances ou rechutes.

Consommée depuis des siècles en médecine traditionnelle sous forme de tisanes de feuilles séchées, la plante d'*Artemisia annua* n'a semble-t-il pas entraîné jusqu'à récemment de développement de résistances chez *Plasmodium falciparum*. Les premières résistances à l'artémisinine et ses dérivés ont fait leur apparition en Asie suite à l'utilisation de l'artémisinine purifiée en monothérapie.

Ces données suggèreraient donc qu'un traitement traditionnel pourrait présenter un avantage face à la lutte contre les résistances. Parmi les scientifiques, deux opinions se distinguent concernant l'efficacité et l'utilisation de cette plante sous forme de tisane.

Pour une majorité d'entre eux, l'utilisation de cette plante, sous toutes les formes que ce soit, et notamment en infusions, pourrait tout à fait être à l'origine de résistances aux traitements conventionnels. C'est aussi l'avis émis en 2012 par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) sur la base de l'analyse de publications rapportant différents essais. L'OMS indique qu'en raison d'une très faible concentration d'artémisinine au sein de la plante, l'efficacité des tisanes

est moindre que celle de la molécule purifiée, et qu'à cela s'ajoute la difficulté de réaliser un contrôle qualité de la plante.

Pour une minorité de scientifiques, en revanche, l'analyse est différente. Toujours en se basant sur les données de la littérature, ils considèrent que l'artémisinine n'est pas le seul composé actif contre le paludisme, présent dans cette plante. Partant de là, l'association de ces molécules serait à l'origine de synergies améliorant ainsi l'efficacité du traitement et limitant les risques de résistances. Dans le même ordre d'idée, il a été proposé qu'*Artemisia annua* puisse contenir des molécules pro-drogues qui seraient métabolisées dans l'organisme en principes actifs. Enfin, un argument supplémentaire de ces scientifiques serait que la culture et le stockage de cette plante représentent de très faibles coûts pour les populations, populations qui n'ont parfois pas la possibilité d'accéder aux traitements conventionnels et qui pourraient peut-être trouver une alternative avec la tisane d'*Artemisia annua*.

Nous voyons bien ici qu'à partir de mêmes données de la littérature, les conclusions sont parfois divergentes voire opposées. Il faut admettre que les résultats obtenus avec les plantes testées varient grandement selon les équipes, selon la nature des essais réalisés *in vitro* et/ou *in vivo*, selon bien évidemment le mode de préparation de la plante et enfin selon son origine géographique.

Tous ces paramètres rendent difficile une analyse étayée. Proposer un avis tranché sur l'intérêt de l'utilisation des plantes sous forme entière en médecine est donc très complexe.

Plusieurs éléments-clés doivent être évalués, que nous reprenons ci-dessous :

a) La complexité chimique des plantes médicinales :

L'utilisation de plantes entières en médecine est complexe puisqu'elles sont composées de nombreuses substances pour lesquelles il faut déterminer l'efficacité, la toxicité et les mécanismes d'action.

On retrouve bien sûr dans les plantes utilisées pour traiter le paludisme de nombreux alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, des terpénoïdes...mais si l'on compare les plantes utilisées en Afrique et en Asie par exemple, la composition telle qu'elle est décrite dans les publications reste extrêmement variable d'une espèce à l'autre. De même, si l'on a tendance à considérer que les alcaloïdes jouent un rôle majeur dans la diminution de la parasitémie, certaines plantes utilisées en Afrique comme *Dichrostachys cinerea*, en sont complètement dépourvues.

De plus, la composition de ces plantes quelles qu'elles soient varie très fortement en fonction de facteurs environnementaux, de la manière dont elles sont cultivées ou conservées. Il est

possible que la composition d'*Artemisia annua* soit différente aujourd'hui de sa composition lorsqu'elle a été utilisée initialement en Chine.

A partir de ce constat, se pose le problème de l'efficacité dans le temps, d'un traitement à base de tisanes. Un moyen d'y remédier pourrait être d'imposer que les plantes médicinales répondent à des critères de composition prédéfinis afin de garantir leur absence de dangerosité.

b) Une complexité liée à la méthode de préparation :

Les effets thérapeutiques anti-paludéens des plantes, comme nous l'avons vu dans les publications, peuvent être évalués à partir d'extraits préparés par différentes méthodes : extraits aqueux par macération ou infusion, extraits alcooliques à l'éthanol ou méthanol. Mais ces modes de préparation, en extraits aqueux principalement, ne sont pas les mêmes en laboratoire et chez les tradi-thérapeutes. En effet, au cours des essais scientifiques, les préparations de tisanes sont faites majoritairement avec de l'eau déminéralisée alors que les tradi-thérapeutes utilisent l'eau qu'ils ont à disposition, plus ou moins riche en minéraux selon sa provenance et les conditions géologiques par exemple. Or, nous avons vu dans l'introduction que l'activation de l'artémisinine se faisait à partir d'ions fer, ces mêmes ions qui sont absents de l'eau utilisée dans les laboratoires. Comment à partir de cet état de fait analyser les effets de la plante, l'absence des ions fer induisant nécessairement une diminution de l'activité de l'artémisinine. De plus, d'un tradithérapeute à l'autre les conditions ne sont pas identiques non plus. La solubilité de l'artémisinine dans l'eau est faible, le solvant utilisé peut lui aussi faire varier les composés absorbés par le patient, le temps d'infusion des feuilles séchées peut avoir un impact sur la nature et la concentration des composants retrouvés dans la tisane.

Par conséquent, de nombreux facteurs liés à la préparation font varier les résultats des différents essais.

La mise en place d'études scientifiques rigoureuses et indépendantes devrait pouvoir permettre d'établir s'il existe un intérêt, et si oui dans quels cas, à utiliser les plantes sous forme de tisane.

c) L'influence du métabolisme :

Un des arguments avancés par les scientifiques favorables au traitement par tisanes repose sur l'existence de potentielles pro-drogues dans les feuilles d'*Artemisia annua*. Ces pro-drogues ne sont pas actives *in vitro* puisque non métabolisées et peu d'essais *in vivo* ont à ce jour été réalisés ce qui ne permet pas de documenter correctement la présence ou non de ces pro-drogues, leur nature et leur éventuelle activité contre *Plasmodium falciparum*.

Un possible effet synergique de ces composants avec l'artémisinine au sein de la tisane a été envisagé par certains scientifiques. Selon leurs études, l'action simultanée de ces molécules avec l'artémisinine pourrait avoir de nombreux effets comme une stimulation du système immunitaire, une diminution des effets secondaires du traitement, une action anti-parasitaire sur des sites d'action différents de ceux connus actuellement ou encore un effet d'augmentation de l'activité d'autres composés. Cependant, en l'état actuel des études, il est difficile de prouver ces synergies et de déterminer les molécules à l'origine de celles-ci. C'est une raison pour laquelle il serait intéressant de poursuivre de nouvelles analyses en tenant compte de ces éléments.

d) Le contexte clinique :

Certains essais montrent que la consommation d'*Artemisia annua* sous forme de tisanes entraîne dans certains cas une baisse importante de la parasitémie mais induit aussi parfois des recrudescences élevées. Ces éléments sont généralement interprétés comme la preuve que les thérapies à base de tisanes sont à l'origine de résistances aux traitements conventionnels.

A ma connaissance, aucune étude n'a à ce jour été réalisée dans le but de déterminer quelles sont les raisons de ces recrudescences. Doit-on considérer qu'il s'agit d'un échec du traitement par lui-même, ou d'un échec en raison d'une durée de traitement inappropriée, ou encore d'un traitement mal suivi ? Cela pose également la question de savoir comment sont évalués les échecs au regard d'une possible réinfection des patients en cours de traitement.

L'ensemble de ces données parfois contradictoires et les difficultés actuelles pour en avoir une vision scientifique claire et construite tendent à conforter l'avis de l'OMS, qui estime que des recherches cliniques et fondamentales seraient nécessaires afin de démontrer que ces utilisations traditionnelles sont sans danger et efficaces contre les infections par *Plasmodium falciparum*.

L'activité et la potentielle toxicité de ces molécules naturelles exige que leur utilisation soit contrôlée et qu'une pharmacovigilance soit effectuée afin de lutter dans les meilleures conditions possibles contre le paludisme et de trouver une issue aux mécanismes de résistances induites par les traitements actuels.

Parallèlement, il ne faut pas négliger la recherche de nouvelles molécules issues de nouvelles plantes. Comme nous l'avons vu, l'*Artemisia annua* n'est pas la seule plante possédant des

molécules ayant une potentielle action antipaludéenne. De nombreuses plantes utilisées par les tradi-thérapeutes, en particulier en Afrique, telles que *Dichrostachys cinerea* et *Strychnos sp.*, sont de potentielles sources pour de nouveaux traitements. Pour ces études à venir, il est nécessaire d'établir dès le départ une démarche rigoureuse, en tenant compte de tous les paramètres qui viennent d'être évoqués.

Bibliographie

1. OMS | Le rapport de cette année en un clin d'oeil. WHO. <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/fr/>. Accessed March 10, 2019.
2. White NJ. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest.* 2004;113(8):1084-1092. doi:10.1172/JCI21682
3. La petite et la grande histoire du paludisme - Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps. <http://www.academie-medecine.fr/la-petite-et-la-grande-histoire-du-paludisme/>. Accessed July 22, 2019.
4. Marciniak S, Prowse TL, Herring DA, et al. Plasmodium falciparum malaria in 1st–2nd century CE southern Italy. *Curr Biol.* 2016;26(23):R1220-R1222. doi:10.1016/j.cub.2016.10.016
5. LAVÉLAN Charles-Louis-Alphonse 1845 - 1922 médecin militaire parasitologue. http://medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/laveran_charles_louis-alphonse.html. Accessed January 13, 2019.
6. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/tu/facts/>. Accessed August 21, 2019.
7. Mazier D, Thellier M. Youyou Tu, de Mao Zedong au Prix Nobel - Prix Nobel de Médecine 2015 : William C. Campbell, Satoshi Ōmura et Youyou Tu. *médecine/sciences.* 2016;32(1):106-109. doi:10.1051/medsci/20163201017
8. Epidémiologie paludisme Pasteur. Institut Pasteur. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/paludisme>. Published October 6, 2015. Accessed January 13, 2019.
9. Paludisme InVS. <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Paludisme/Aide-memoire>. Accessed January 13, 2019.
10. BEH mai 2018 - Santé publique France. Santé Publique France. <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/voyage/documents/magazines-revues/bulletin-epidemiologique-hebdomadaire-25-mai-2018-n-hors-serie-recommandations-sanitaires-pour-les-voyageurs-2018>. Published May 2018. Accessed January 19, 2019.
11. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Published January 28, 2019. Accessed August 20, 2019.
12. ANOPHEL cours ECN UVMF 2014. <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf>. Accessed March 11, 2019.

13. Collins WE. *Plasmodium knowlesi*: A Malaria Parasite of Monkeys and Humans. *Annu Rev Entomol.* 2012;57(1):107-121. doi:10.1146/annurev-ento-121510-133540
14. CMIT. *ECN PILLY: maladies infectieuses et tropicales. 5ème édition.* ALINEAS Plus. 8, Rue Froidevaux 75014 Paris: MED-LINE EDITIONS - EDUC; 2017.
15. BEH Recommandations sanitaires pour les voyageurs Hors série Mai 2019. Santé Publique France. <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/voyage/documents/magazines-revues/bulletin-epidemiologique-hebdomadaire-21-mai-2019-n-hors-serie-recommandations-sanitaires-pour-les-voyageurs-2019>. Published May 2019. Accessed October 20, 2019.
16. ITH2010chapter7fr.pdf. <https://www.who.int/ith/ITH2010chapter7fr.pdf>. Accessed January 15, 2020.
17. Ouji M, Augereau J-M, Paloque L, Benoit-Vical F. Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. *Parasite.* 25. doi:10.1051/parasite/2018021
18. Résistance aux médicaments antipaludiques : Vue d'ensemble. WorldWide Antimalarial Resistance Network. <https://www.wwarn.org/fr/propos-de-nous/resistance-aux-medicaments-antipaludiques-vue-densemble>. Published February 17, 2015. Accessed October 20, 2019.
19. Comparative structural and evolutionary analyses predict functional sites in the artemisinin resistance malaria protein K13 | Scientific Reports. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-47034-6>. Accessed October 20, 2019.
20. Burrows J. Microbiology: Malaria runs rings round artemisinin. *Nature.* 2015;520(7549):628-630. doi:10.1038/nature14387
21. Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in Plasmodium falciparum clinical isolates. *Science.* 2015;347(6220):428-431. doi:10.1126/science.1260867
22. Association of mutations in the Plasmodium falciparum Kelch13 gene (Pf3D7_1343700) with parasite clearance rates after artemisinin-based treatments—a WWARN individual patient data meta-analysis. *BMC Med.* 2019;17. doi:10.1186/s12916-018-1207-3
23. Ibraheem ZO, Abd Majid R, Noor SMohd, Sedik HMohd, Basir R. Role of Different Pfcrt and Pfmdr-1 Mutations in Conferring Resistance to Antimalaria Drugs in Plasmodium falciparum. *Malar Res Treat.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/950424
24. A framework for assessing the risk of resistance for anti-malarials in development | Malaria Journal | Full Text. <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-292>. Accessed October 21, 2019.
25. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, et al. Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *N Engl J Med.* 2009;361(5):455-467. doi:10.1056/NEJMoa0808859

26. Bruneton J. *Pharmacognosie / Phytochimie Plantes Médicinales*. 4ème édition. Editions Tec & Doc ; Editions médicales internationales; 2009.
27. Zhang X, Zhao Y, Guo L, Qiu Z, Huang L, Qu X. Differences in chemical constituents of *Artemisia annua* L from different geographical regions in China. *PLoS ONE*. 2017;12(9). doi:10.1371/journal.pone.0183047
28. Muangphrom P, Seki H, Fukushima EO, Muranaka T. Artemisinin-based antimalarial research: application of biotechnology to the production of artemisinin, its mode of action, and the mechanism of resistance of *Plasmodium* parasites. *J Nat Med*. 2016;70:318-334. doi:10.1007/s11418-016-1008-y
29. Krishna S, Bustamante L, Haynes RK, Staines HM. Artemisinins: their growing importance in medicine. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(10):520-527. doi:10.1016/j.tips.2008.07.004
30. Wang J, Zhang C-J, Chia WN, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun*. 2015;6:10111. doi:10.1038/ncomms10111
31. Elfawal MA, Towler MJ, Reich NG, Weathers PJ, Rich SM. Dried whole-plant *Artemisia annua* slows evolution of malaria drug resistance and overcomes resistance to artemisinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(3):821-826. doi:10.1073/pnas.1413127112
32. Mueller MS, Runyambo N, Wagner I, Borrmann S, Dietz K, Heide L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(5):318-321. doi:10.1016/j.trstmh.2003.09.001
33. Munyangi J, Cornet-Vernet L, Idumbo M, et al. *Artemisia annua* and *Artemisia afra* tea infusions vs. artesunate-amodiaquine (ASAQ) in treating *Plasmodium falciparum* malaria in a large scale, double blind, randomized clinical trial. *Phytomedicine*. 2019;57:49-56. doi:10.1016/j.phymed.2018.12.002
34. Suberu JO, Gorka AP, Jacobs L, et al. Anti-Plasmodial Polyvalent Interactions in *Artemisia annua* L. Aqueous Extract – Possible Synergistic and Resistance Mechanisms. *PLoS ONE*. 2013;8(11). doi:10.1371/journal.pone.0080790
35. Frederich M, Tits M, Angenot L. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Chem Nat Compd*. 2003;39(6):7.
36. Kweyamba PA, Zofou D, Efange N, Assob J-CN, Kitau J, Nyindo M. In vitro and in vivo studies on anti-malarial activity of *Commiphora africana* and *Dichrostachys cinerea* used by the Maasai in Arusha region, Tanzania. *Malar J*. 2019;18(1). doi:10.1186/s12936-019-2752-8
37. Asrade S, Mengesha Y, Moges G, Gelayee DA. In vivo antiplasmodial activity evaluation of the leaves of *Balanites rotundifolia* (Van Tiegh.) Blatter (Balanitaceae) against *Plasmodium berghei*. *J Exp Pharmacol*. 2017;Volume 9:59-66. doi:10.2147/JEP.S130491
38. Nonaka M, Murata Y, Takano R, Han Y, Kabir MdHB, Kato K. Screening of a library of traditional Chinese medicines to identify anti-malarial compounds and extracts. *Malar J*. 2018;17(1):244. doi:10.1186/s12936-018-2392-4

39. Haddad MHF, Mahbodfar H, Zamani Z, Ramazani A. Antimalarial evaluation of selected medicinal plant extracts used in Iranian traditional medicine. *Iran J Basic Med Sci.* 2017;20(4):415-422. doi:10.22038/IJBMS.2017.8583
40. Galliard H, Lapierre J, Golvan Y. L'hyaluronidase dans les infections à Protistes sanguicoles et en particulier *Plasmodium berghei*. Action comparée avec la phénylhydrazine. Rôle et signification de la réticulocytose. *Ann Parasitol Hum Comparée.* 1954;29(4):330-346. doi:10.1051/parasite/1954294330
41. Ramadhani SON, Denis Z, Mainen JM, et al. Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of medicinal plants used to treat malaria in Kagera and Lindi regions, Tanzania. *J Med Plants Res.* 2015;9(6):179-192. doi:10.5897/JMPR2014.5685
42. Tariq A, Adnan M, Amber R, Pan K, Mussarat S, Shinwari ZK. Ethnomedicines and anti-parasitic activities of Pakistani medicinal plants against Plasmodia and Leishmania parasites. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15. doi:10.1186/s12941-016-0170-0

Abréviations

ABC : ATP binding cassette

ACTs : Artemisinin-based combination therapy

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ASAQ : Artésunate + Amodiaquine

BTB : Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac)

CC₅₀ : Concentration cytotoxique médiane

DMSO : Diméthylsulfoxyde

FIC : Fractional Inhibitory Concentration

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate buffer saline

PC_{1/2} : Clairance de 50% du parasite

PfCRT : *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

PfMDR1 : *Plasmodium falciparum* multi drug resistance

PfMRP : *Plasmodium falciparum* multi drug resistance associated protein

Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Charles-Louis-Alphonse Laveran et Ronald Ross (nlm.nih.gov Wikimedia commons et wellcomecollection.org) | 3 |
| Figure 2 : Risque statistique de contamination à Plasmodium falciparum au cours d'un séjour de moins d'un mois, CHU de Rouen (Wikimedia Commons)..... | 6 |
| Figure 3 : Anopheles stephensi au cours d'un repas de sang d'un hôte humain (Bibliothèque d'image de santé publique-Wikimedia Commons) | 6 |
| Figure 4 : Cycle de reproduction de Plasmodium (dpd.cdc.gov Wikimedia Commons)..... | 8 |
| Figure 5 : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium falciparum (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL)..... | 9 |
| Figure 6 : Transmission du paludisme à P. falciparum en fonction de la période de l'année, CHU Rouen- (Wikimedia Commons)..... | 10 |
| Figure 7 : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium vivax (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL) | 11 |
| Figure 8 : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium ovale (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL) | 12 |
| Figure 9 : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium malariae (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL) | 12 |
| Figure 10 : Répartition géographique du paludisme à Plasmodium knowlesi (Campus de Parasitologie Mycologie ANOFEL) | 13 |
| Figure 11 : Plasmodium falciparum au stade anneau dans un frottis sanguin ; Dr. Greene, USCDCP | 14 |
| Figure 12 : Schéma décisionnel du traitement d'une infection par Plasmodium falciparum (Selon le Vidal.fr).... | 17 |
| Figure 13 : Régulation de la croissance et de la survie cellulaire par la voie PI3K (d'après Burrows, 2015) | 19 |
| Figure 14 : Conséquences d'une mutation de la protéine Kelch13 sur les voies de signalisation intracellulaires (d'après Burrows, 2015) | 19 |
| Figure 15 : Mutations du gène Pfk13 et localisation chez Plasmodium falciparum (Straimer et al, 2015) | 21 |
| Figure 16 : (A) Demi-vie de clairance parasitaire pour la souche sauvage (WT) ou des souches mutées pour la protéine Kelch13 dans les isolats asiatiques. Entre parenthèse le nombre d'isolats individuels testés pour chaque mutation (B) Demi-vie de clairance parasite pour les mutations retrouvées dans moins de 5 isolats (WWARN K13 Genotype-Phenotype Study Group)..... | 22 |
| Figure 17 : (A) Demi-vie de clairance parasitaire pour la souche sauvage ou des souches ayant subi des mutations sur la protéine Kelch13 dans les isolats africains. Entre parenthèse le nombre d'isolats individuels testés pour chaque mutation (B) Demi-vie de clairance parasitaire pour les mutations retrouvées dans moins de 5 isolats | 23 |
| Figure 18 : Mécanismes des résistances aux traitements impliquant les transporteurs ABC | 24 |
| Figure 19 : Mutations de la protéine transmembranaire PfMDR-1 et variants retrouvés dans des isolats de Plasmodium falciparum en fonction de la localisation géographique (d'après S.G.Valderramos et D.A.Fidock) . | 25 |

| | |
|---|----|
| Figure 20 : Mutations de la protéine PfcRT et variants retrouvés dans des isolats de <i>Plasmodium falciparum</i> en fonction de la localisation géographique (d'après S. G. Valderramos et D. A. Fidock) | 26 |
| Figure 21 : Densités parasitaires (log10) en fonction du temps pour les 20 patients dans chacun des sous-groupes de traitement. (Dondorp et al, 2009) | 27 |
| Figure 22 : <i>Artemisia annua</i> L. (Kristian Peters-Wikimedia Commons)..... | 29 |
| Figure 23 : Concentrations des différents constituants chimiques d' <i>A. annua</i> en fonction de la région récolte en Chine.(Zhang, 2017). | 29 |
| Figure 24 : Biosynthèse de l'artémisinine (Mephisto spa-Wikimedia Commons) | 30 |
| Figure 25 : Structure chimique de l'artémisinine et de ses dérivés, Krishna et al. 2008..... | 31 |
| Figure 26 : Sites d'action des différents traitements préventifs et curatifs contre les infections à <i>Plasmodium</i> chez l'Homme, d'après ddp.cdc.gov Wikimedia Commons..... | 31 |
| Figure 27 : Modèle résumant le mécanisme d'activation de l'artémisinine par l'hème d'après Wang, 2015 | 32 |
| Figure 28 : Pont endopéroxyde de l'artémisinine (Wikimedia Commons) | 33 |
| Figure 29 : Variation du pourcentage de globules rouges parasités avant et après traitement par artémisinine pure (AN) et <i>Artemisia annua</i> (WP) à la dose de 120mg/kg (Figure 29A) ou 24mg/kg (Figure 29B). CON : groupe témoin, souris non traitées (Elfawal et al; 2015) | 34 |
| Figure 30 : Variation du pourcentage de globules rouges parasités par <i>P. yoelii</i> résistant à l'artémisinine. J0 : inoculation du parasite et J2 à J10 inclus traitement par artémisinine pure (AN) ou <i>Artemisia annua</i> plante entière (WP) à la dose de 120mg/kg (Elfawal) | 35 |
| Figure 31 : Résultats des essais réalisés comparant les effets de tisanes d' <i>Artemisia annua</i> à 5 (A5) et 9 (A9)g/L et celui de la quinine (QN) sur un groupe de patients impaludés. D'après Muller et al ; 2004 | 37 |
| Figure 32 : Schéma de prise du traitement pour le groupe ASAQ | 39 |
| Figure 33 : Schéma de prise du traitement pour le groupe <i>Artemisia</i> sp. | 39 |
| Figure 34 : Molécules présentes dans les extraits aqueux d' <i>Artemisia annua</i> (Suberu et al ; 2013)..... | 43 |
| Figure 35 : IC50 des principaux alcaloïdes présents chez <i>Strychnos icaia</i> ainsi que les IC50 de la chloroquine et de la quinine sur différentes souches de <i>Plasmodium</i> .(Frederich et al ; 2003) | 47 |
| Figure 36 : IC50 de plusieurs alcaloïdes indoliques retrouvés dans <i>Strychnos</i> sp. Sur trois souches différentes de <i>Plasmodium falciparum</i> et IC50 de la chloroquine, de la quinine et de l'artémisinine sur ces mêmes souches (Frederich et al ; 2003) | 49 |
| Figure 37 : Evaluation de l'inhibition de croissance relative (% du contrôle) à 96 h pour chacune des 96 substances naturelles. Les essais sont réalisés sur des globules rouges humains infectés par la souche 3D7 de <i>Plasmodium falciparum</i> résistante à la chloroquine. Le contrôle négatif correspond à du DMSO 0,1% seul, le contrôle positif à de la pyriméthamine 10µM (Nonaka et al ;2018)..... | 56 |
| Figure 38 : Effet dose-dépendant des composés sur le pourcentage de parasitémie à 4 jours, pour la souche 3D7 (Nonaka et al ; 2018)..... | 57 |
| Figure 39 : Effet dose-dépendant des composés sur le pourcentage de parasitémie à 4 jours de la souche D2d (Nonaka et al ; 2018)..... | 59 |

Figure 40 : Survie des cellules de la lignée 293T en fonction de différentes concentration de chacune des substances extraites (Nonaka et al ; 2018) 60

Figure 41 : Pourcentage d'inhibition de P. falciparum par les différentes substances testées en fonction du stade de développement du parasite..... 61

Tableaux

| | |
|--|-----------|
| <i>Tableau 1 : Les mutations validées (en gras) et les mutations potentiellement associées à la résistance mais non validées in vitro (colonne de droite).....</i> | <i>20</i> |
| <i>Tableau 2 : Mutations ou amplifications de gènes observées dans les groupes de patients (d'après Dondorp et al.).....</i> | <i>28</i> |
| <i>Tableau 3 : Pourcentage de patients dont la parasitémie est nulle en fonction du temps et du traitement donné et pourcentage de patients sans symptômes à J3 d'après Muller et al ; 2004</i> | <i>38</i> |
| <i>Tableau 4 : Effets indésirables relevés au cours de l'essai dans chacun des deux groupes, d'après Munyangi et al ; 2019</i> | <i>41</i> |
| <i>Tableau 5 : Composés majoritaires retrouvés dans les infusions d'Artemisia annua (dosage par HPLC), d'après Suberu et al ; 2013</i> | <i>42</i> |
| <i>Tableau 6 : IC50 d'extraits et de composants issus d'Artemisia annua sur des souches sensibles (HB3) et résistantes (Dd2) à la chloroquine (Suberu et al. 2013).....</i> | <i>44</i> |
| <i>Tableau 7 : Interactions entre les différentes molécules présentes chez Artemisia annua (Suberu et al ; 2013)..</i> | <i>45</i> |
| <i>Tableau 8 : IC50 et CC50 des différents extraits de plantes, d'après Kweyamba et al ; 2019.....</i> | <i>51</i> |
| <i>Tableau 9 : Clairance parasitaire, variations de poids et survie des différents groupes de souris traités par deux extraits de dichlorométhane de plantes (Kweyamba et al ; 2019).....</i> | <i>52</i> |
| <i>Tableau 10 : Pourcentage de suppression parasitaire et nombre de jours de survie des différentes concentrations de B. rotundifolia, d'après Asrade et al ; 2017.....</i> | <i>54</i> |
| <i>Tableau 11 : Variations du poids moyen (en grammes) des différents groupes de souris en fonction des extraits utilisés (Asrade et al ; 2017).....</i> | <i>54</i> |
| <i>Tableau 12 : Pourcentage de suppression parasitaire et nombre de jours de survie des différentes concentrations de B. rotundifolia, d'après Asrade et al ; 2017.....</i> | <i>55</i> |
| <i>Tableau 13 : Variations du poids moyen (en grammes) des différents groupes de souris en fonction des extraits utilisés d'après Asrade et al ; 2017.....</i> | <i>55</i> |
| <i>Tableau 14 : Taux d'inhibition de croissance et IC50 des différentes substances testées sur la souche 3D7 de P. falciparum (Nonaka et al ; 2018)</i> | <i>57</i> |
| <i>Tableau 15 : Taux d'inhibition de croissance et IC50 des différentes substances testées sur les souches D2d de P. falciparum (Nonaka et al ; 2018)</i> | <i>58</i> |
| <i>Tableau 16 : Plantes iraniennes testées in vitro sur deux souches de P. falciparum, d'après Haddad et al ; 2017</i> | <i>62</i> |
| <i>Tableau 17 : Parasitémie moyenne, pourcentage d'inhibition et pourcentage de survie des souris traitées par trois extraits de plantes d'après Haddad et al ; 2017</i> | <i>63</i> |
| <i>Tableau 18 : CC50 des trois extraits sur la lignée cellulaire Raji (Haddad et al, 2017).....</i> | <i>64</i> |
| <i>Tableau 19 : Analyse in vitro du pourcentage d'inhibition des plantes utilisées contre Plasmodium falciparum en fonction de leur concentration et composés principaux de celles-ci (Tariq et al, 2016).....</i> | <i>65</i> |

Résumé

Le paludisme est responsable de plus de 500 000 décès par an dans le monde et notamment en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud-Est. Il existe actuellement des traitements préventifs et curatifs mais ce parasite a montré sa capacité à développer rapidement des résistances lui permettant d'échapper aux traitements. Ces résistances apparaissent par le biais de mécanismes moléculaires variés activant les voies de survie cellulaire ou les mécanismes d'élimination des xénobiotiques par les cellules infectées.

Depuis le début des années 2000 et l'apparition en Asie des premières résistances suite à l'utilisation de molécules purifiées en monothérapie, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) recommande d'utiliser des polythérapies dans le traitement du paludisme. Parmi ces polythérapies, les ACTs (Artemisinin-based Combination Therapies) associant des dérivés de l'artémisinine, une plante utilisée par les tradi-thérapeutes sous forme de tisanes dans le traitement des infections paludéennes, à d'autres antipaludéens sont actuellement les seuls traitements curatifs encore actifs sur les infections à *Plasmodium falciparum*.

Cependant, face au risque d'apparition de résistances à l'artémisinine, il devient urgent de trouver de nouvelles molécules et/ou de nouvelles associations thérapeutiques.

Se baser sur les connaissances ancestrales empiriques des tradi-thérapeutes et y associer une démarche scientifique rigoureuse pourrait permettre de lever les réticences qui s'expriment sur l'utilisation de ces plantes dans le traitement du paludisme. Il serait possible ainsi de mieux caractériser les plantes d'intérêt et les molécules actives qu'elles contiennent, d'évaluer les modes d'administration et de réduire les risques potentiels de cytotoxicité, afin d'établir de nouveaux traitements.

Resume

Malaria is responsible for more than 500,000 deaths a year in the world, particularly in sub-Saharan Africa and Southeast Asia. Currently, preventive and curative treatments exist but the parasite develops resistance to escape treatment. These resistances appear through various molecular mechanisms such as activation of cell survival pathways or increased elimination of xenobiotics by infected cells.

Since the early 2000s and the emergence of early resistances following the use of purified molecules in monotherapy in Asia, the WHO (World Health Organization) recommends the use of polytherapies in the treatment of malaria. Among these combination therapies, ACTs (Artemisinin-based Combination Therapies) associating derivatives of artemisinin, a plant used by traditional healers in the form of herbal teas in the treatment of malarial infections, with other antimalarials are currently the only treatments still active on *Plasmodium falciparum* infections.

However, faced with the risk of the occurrence of new resistances to artemisinin, new molecules and/or new therapeutic combinations are urgently needed.

Relying on the ancestral empirical knowledge of traditional healers and combining it with a rigorous scientific approach could help to relieve the reluctance about the use of herbal teas in the treatment of malaria. It would be possible to better characterize the plants of interest and the active molecules which they contain, to evaluate the modes of administration and to reduce the potential risks of cytotoxicity, in order to provide new treatments.

Mots-clés : paludisme, ACTs, résistances, artémisinine, *Artemisia annua*, médecine traditionnelle



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

Je honorerai ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoignage ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

Je exercerai, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

Je ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

Je ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

Je faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens,
Je coopérer avec les autres professionnels de santé.
En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Signature de l'étudiant

du Président du jury

Nom :

Nom :

Prénom :

Prénom :