

ÉCOLE DOCTORALE 222 - SCIENCES CHIMIQUES
UMR 7200 Laboratoire d'Innovation Thérapeutique
EA 7292 Dynamique des Interactions Hôte-Pathogène

THÈSE présentée par :

Flore NARDELLA

soutenue le : 23 mai 2017

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie biologique et thérapeutique

**Flavones substituées : une nouvelle
classe de composés pour le traitement
du paludisme**
Optimisation vers un candidat médicament

THÈSE dirigée par :

Mme VONTHRON-SENECHEAU Catherine
M CANDOLFI Ermanno

MCU-HDR, Université de Strasbourg
PU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BENOIT-VICAL Françoise
M PRADINES Bruno

DR, Université de Toulouse, Paul-Sabatier
PharmD-PhD-HDR, Institut de
Recherche Biomédicale des Armées

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme MAZIER Dominique
Mme DAVILOUD-CHARVET Elisabeth

PU-PH, Université Pierre et Marie Curie
DR, Université de Strasbourg

ÉCOLE DOCTORALE 222 - SCIENCES CHIMIQUES
UMR 7200 Laboratoire d'Innovation Thérapeutique
EA 7292 Dynamique des Interactions Hôte-Pathogène

THÈSE présentée par :

Flore NARDELLA

soutenue le : **23 mai 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie biologique et thérapeutique

**Flavones substituées : une nouvelle
classe de composés pour le traitement
du paludisme**

Optimisation vers un candidat médicament

THÈSE dirigée par :

Mme VONTHRON-SENECHEAU Catherine
M CANDOLFI Ermanno

MCU-HDR, Université de Strasbourg
PU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BENOIT-VICAL Françoise
M PRADINES Bruno

DR, Université de Toulouse, Paul-Sabatier
PharmD-PhD-HDR, Institut de
Recherche Biomédicale des Armées

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme MAZIER Dominique
Mme DAVIOUD-CHARVET Elisabeth

PU-PH, Université Pierre et Marie Curie
DR, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier tout particulièrement mes co-directeurs de thèse, Catherine Vonthron-Sénécheau et Ermanno Candolfi, pour m'avoir accueillie à bras ouverts au sein de leurs laboratoires et pour m'avoir fait confiance durant ces 4 années. Merci de m'avoir proposé un sujet alliant pharmacognosie et parasitologie, deux domaines qui me tiennent à cœur. Catherine, j'ai grandi scientifiquement à tes côtés et je t'en remercie infiniment. Tu m'as toujours fait confiance et soutenue, quelle que soit ma demande et ce malgré ton emploi du temps chargé. Je n'aurais pas pu partir au Cambodge sans ton aide et ta disponibilité pour mes démarches administratives interminables et dans bien d'autres situations analogues. Merci également pour l'enthousiasme dont tu fais preuve lors de nos échanges autour de mes résultats, lorsque je souhaite réaliser une formation ou tout simplement au jour le jour. Ermanno, merci de m'avoir donné accès et fait une place à l'institut où j'ai passé beaucoup de temps, merci de tes conseils avisés et pour l'organisation des réunions régulières pour discuter de nos résultats. Merci de ton implication dans ce projet qui est parfois éloigné de ta thématique d'intérêt et pour m'avoir inculqué la méthodologie et la rigueur nécessaires à la réalisation d'un projet scientifique. Merci aussi pour tes réponses rapides à mes demandes, pour m'avoir permis d'expérimenter le *reviewing* et de m'avoir permis d'assister au congrès de l'ASTMH à Atlanta.

Merci à Françoise Benoit-Vical et Frédéric Bihel d'avoir accepté de participer à mon comité de mi-thèse et pour les orientations proposées pour la suite de mes travaux.

Merci aux rapporteurs Françoise Benoit-Vical et Bruno Pradines de m'avoir fait l'honneur et le plaisir d'évaluer ces travaux de thèse en qualité de rapporteurs. Merci aux examinateurs, Dominique Mazier et Elisabeth Davioud-Charvet, d'avoir accepté de juger ces travaux et d'apporter leur expertise à ce projet.

Ces travaux n'auraient pas pu avoir lieu sans la collaboration de Cécile Lang, ingénieure d'études à l'Institut de Parasitologie, qui m'a appris la culture de *Plasmodium* et la réalisation des tests ELISA. Merci également pour l'aide ponctuelle que tu m'as apportée pour l'entretien des cultures et pour ta compagnie dans notre grand bureau ! Merci à Lydia pour m'avoir appris la culture cellulaire et l'entretien des souches de *Toxoplasma*, mais également pour avoir pris le relai après mes manipulations de nuit. Merci à Alexander pour son aide concernant la partie expérimentation animale. Et bien-sûr merci à Esterina, Julie, Cécile et Lydia et Marcelo pour les bons moments passés ensemble, pour votre soutien et votre imagination infinie (et pour le colis qui a failli moisir à la poste de Phnom Penh) !

Merci à Marcel Hibert, directeur de l'UMR 7200, pour m'avoir acceptée au sein du laboratoire et soutenue pour mes demandes de bourses. Merci également d'avoir suivi l'évolution de ce projet et apporté des conseils pertinents.

Merci aux membres du groupe *substances naturelles antiprotozoaires* dirigé par Catherine. Merci à Jean-Baptiste Gallé (alias JiBé) pour son soutien, ses conseils toujours avisés, ses critiques constructives et bien-sûr pour sa compagnie. Merci également d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit. Merci à Mélanie, Laure et Nicolas, pour les attentions qu'ils ont eues à mon égard.

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans la contribution des chimistes, Valérie Collot et Silvia Stiebing au CERMN de Caen et Martine Schmitt et Patrick Wagner de l'UMR 7200. Merci pour votre immense contribution à ce projet, pour votre (hyper)réactivité et votre disponibilité. Merci également pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir et pour les quelques jours passés à Caen en votre compagnie.

Merci à Benoit Witkowski et Didier Ménard pour m'avoir accueillie à l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC). Merci à Benoit pour m'avoir fait confiance pour son encadrement scientifique et les futures publications qui devraient émaner du travail réalisé sur place. Merci à Anaïs Domergue, ingénieure, pour m'avoir formée à l'IPC et pour les bons moments que l'on a partagés.

Merci également à Andréa Hemmerlin pour m'avoir permis de réaliser des tests au sein de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes et pour les discussions que nous avons eues autour de la voie du MEP.

Je n'oublie pas les stagiaires BTS Axel Sieffer et Emilie Mathis qui ont fait preuve d'assiduité et d'une grande maturité et qui m'ont permis d'avancer ces travaux de thèse.

Merci à mes proches et ma famille pour leurs encouragements et l'amour qu'ils me portent, et notamment mes parents pour leur soutien financier tout au long de mes interminables études. Merci à mes amis d'horizons divers, en particulier Cécilia (bff, qui a toujours cru en moi), Emilie et Morgane pour avoir pris des nouvelles régulières.

Enfin, *last but not least*, merci à mon Pablo pour ton soutien indéfectible, pour ta patience et ta compréhension dans mes moments de doutes ou de stress, pour me pousser à aller toujours plus loin, pour m'avoir encouragée à aller au Cambodge malgré les six mois de séparation et avoir fait l'effort de m'y rendre visite bien que tu étais un peu fébrile initialement. Merci pour l'amour que tu me témoignes chaque jour, pour les petites attentions quotidiennes et pour ton humour. Cette thèse n'aurait pas eu le même goût sans toi.

“ *Quelqu'un qui fait sa thèse sur la syphilis finit même par aimer le spirochète pâle.*
Umberto Eco

Table des matières

<u>Remerciements</u>	ii
<u>Liste des figures</u>	xiv
<u>Liste des tableaux</u>	xx
<u>Liste des abréviations</u>	xxii
<u>Introduction générale</u>	1
<u>Etat de l'art et contexte de l'étude</u>	5
A. <u>Eléments généraux sur le paludisme et <i>Plasmodium</i></u>	8
1. <u>Données épidémiologiques</u>	8
i. <u>Chiffres clés</u>	8
ii. <u>Influence du vecteur : l'anophèle femelle</u>	9
iii. <u>Influence de l'hôte</u>	10
iv. <u>Influence du parasite</u>	11
2. <u>Cycle de développement de <i>Plasmodium</i></u>	12
i. <u>Schizogonie exo-érythrocytaire ou hépatique</u>	14
ii. <u>Schizogonie érythrocytaire</u>	15
iii. <u>Gamogonie</u>	20
iv. <u>Sporogonie</u>	21
3. <u>Physiopathologie</u>	21
i. <u>Paludisme non compliqué à <i>P. falciparum</i>, <i>P. vivax</i>, <i>P. ovale</i>, <i>P. malariae</i> et <i>P. knowlesi</i></u>	21
ii. <u>Paludisme compliqué à <i>P. falciparum</i></u>	23
a. <u>Physiopathologie</u>	23
b. <u>Symptomatologie</u>	24
iii. <u>Paludisme compliqué à <i>P. vivax</i></u>	26
iv. <u>Paludisme et grossesse</u>	26
4. <u>Prise en charge du paludisme</u>	27
i. <u>Non compliqué à <i>P. falciparum</i></u>	27
ii. <u>Non compliqué à <i>P. vivax</i>, <i>P. ovale</i>, <i>P. malariae</i> et <i>P. knowlesi</i></u>	28
iii. <u>Compliqué à <i>P. falciparum</i></u>	29
iv. <u>Paludisme grave à <i>P. vivax</i> et <i>P. knowlesi</i></u>	30
B. <u>Traitements antipaludiques actuels et en développement clinique</u>	30
1. <u>Alcaloïdes du quinquina</u>	31

2.	Amino-alcools	33
3.	4-aminoquinoléines	34
i.	Chloroquine	35
ii.	Amodiaquine	37
iii.	Pipéraquline	38
iv.	Nouvelles molécules dérivées	39
a.	Pyronaridine	39
b.	Ferroquine	39
c.	AQ-13	40
d.	Naphtoquine	40
4.	8-aminoquinoléines	40
i.	Primaquine	41
ii.	Tafénoquine	42
5.	Antifolates	42
6.	Endopéroxydes	44
i.	Dérivés de l'artémisinine	44
ii.	Nouveaux endopéroxydes	47
a.	Artémisone	47
b.	Ozonides	47
7.	Naphtoquinones	48
8.	Antibiotiques	49
i.	Lincosamides	49
ii.	Tétracyclines	49
iii.	Macrolides	50
iv.	Inhibiteur de la voie du MEP	50
9.	Nouvelles classes d'antipaludiques	50
i.	Imidazolopipérazines	51
ii.	Inhibiteurs de PfATP4	52
iii.	Inhibiteurs de la DHODH	52
iv.	Inhibiteur de l'absorption de choline	53
C.	Flavonoïdes et flavones	53
1.	Etude bibliographique des flavonoïdes présentant une activité antipaludique	54
i.	Activité antipaludique en fonction de la classe de flavonoïde	56
ii.	Activité antipaludique des flavones et flavonols en fonction du type de substituant	59
iii.	Influence de la position et de la nature de la substitution des flavones et flavonols	60

iv.	Activité antipaludique des flavones et flavonols en fonction du statut de résistance des souches de <i>P. falciparum</i>	63
2.	Mécanismes d'action et propriétés des flavonoïdes décrits vis-à-vis des protozoaires	63
i.	Voies métaboliques de l'apicoplaste	63
a.	Voie de biosynthèse des acides gras	64
b.	Inhibition de la ferredoxin-NADP⁺ reductase	66
ii.	Mitochondrie et apoptose	67
iii.	Hémoglobine	72
a.	Protéases impliquées dans la digestion de l'hémoglobine	72
b.	Polymérisation de l'hème	74
iv.	Division parasitaire	74
v.	New Permeability Pathways et membrane de l'érythrocyte	75
vi.	Effets décrits sur les stades hépatiques, sexués et sur la splénomégalie	75
vii.	Conclusion	76
D.	Contexte et objectifs de la thèse	79
	Bibliographie du chapitre état de l'art et contexte de l'étude	85

[Chapitre 1. Propriétés pharmacologiques du composé tête-de-série MR27770](#)..... 97

A.	Introduction	99
B.	Cahier des charges d'un composé tête-de-série de type TCP-1 selon les lignes directrices de MMV	100
1.	Propriétés chimiques	100
2.	Propriétés pharmacologiques	100
3.	Propriétés pharmacocinétiques et métabolisme	101
4.	Efficacité chez l'animal	101
5.	Sécurité d'emploi	101
C.	Propriétés du composé MR27770, chef-de-file des dérivés de la lanaroflavone	101
1.	Propriétés chimiques	101
2.	Propriétés pharmacologiques	103
i.	Activité antipaludique et sélectivité	103
ii.	Liaison du composé aux protéines plasmatiques	104
iii.	Profil d'action sur le cycle érythrocytaire	104
iv.	Rapidité d'action « killing rate »	108
v.	Activité vis-à-vis d'isolats cambodgiens de <i>P. falciparum</i> adaptés à la culture	110

a.	Caractérisation des résistances associées aux isolats cliniques utilisés dans l'étude	110
b.	Activité de MR27770 vis-à-vis des isolats cliniques caractérisés	114
1)	Résistants à l'artémisinine	114
i)	A concentration fixe vs concentration fixe de DHA	114
ii)	A l'aide d'une gamme de concentration en présence ou en absence d'artémisinine	115
iii)	Activité de MR27770 vis-à-vis d'isolats résistants à l'artémisinine mutés sur le gène <i>kelch13</i>	117
2)	Résistants à la pipéraquline	118
3)	Résistants à la méfloquine et à l'amodiaquine	119
vi.	Sélection de mutants résistants à MR27770	120
3.	Propriétés pharmacocinétiques et métabolisme	122
i.	Paramètres mesurés <i>in vitro</i>	122
ii.	Paramètres mesurés <i>in vivo</i>	122
4.	Efficacité <i>in vivo</i>	125
5.	Sécurité d'emploi	125
D.	Conclusion	125
	Bibliographie du chapitre 1	129

Chapitre 2. Exploration du mécanisme d'action du composé tête-de-série MR27770 .. 133

A.	Résultats obtenus par screening phénotypique	135
1.	Phénotype induit par MR27770	135
2.	Inhibition du processus d'invasion	140
3.	Combinaisons de drogues	143
i.	Combinaison MR27770/dihydroartémisinine	143
ii.	Combinaison MR27770/chloroquine	144
iii.	Combinaison MR27770/méfloquine	144
iv.	Combinaison MR27770/atovaquone	145
v.	Combinaison MR27770/pyriméthamine	146
4.	Activité vis-à-vis des stades hépatiques (modèle murin, coll. D. Mazier)	146
i.	Modèle <i>P. yoelii</i>/cellules HepG2CD81	146
ii.	Modèle <i>P. berghei</i>/hépatocytes primaires de singe	147
5.	Effet sur d'autres parasites protozoaires	148
i.	Activités mesurées vis-à-vis des Kinétoplastidés	149

ii. Activités mesurées vis-à-vis des Apicomplexes	149
B. Voies métaboliques et mécanismes investigués	150
1. Effet sur la digestion de l'hémoglobine	150
2. New Permeability Pathways	151
3. Activité mesurée vis-à-vis de kinases humaines, de Plasmodium et de Leishmania	152
4. Inhibition de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes (MEP) ou de la prénylation des protéines	153
C. Conclusion	154
Bibliographie du chapitre 2	157
Chapitre 3. Etude de type relation structure-activité	159
A. Introduction	161
B. Stratégie employée	163
C. Composés de référence	164
D. Analogues synthétiques simplifiés de la lanaroflavone	165
1. Série 3',4'-di-O-méthylée	165
i. Importance des méthoxyles sur le cycle B	166
ii. Rôle des méthoxyles en positions 5 et 7 du cycle A	167
iii. Importance de l'atome d'azote	169
iv. Importance de la position de l'amine dans l'espace	170
v. Effet de la cyclisation de l'amine en position 8	173
vi. Rigidification de la position de l'azote	175
2. Série substituée en 7	179
3. Série 4'-O-benzyle	182
E. Profil pharmacologique des dérivés de MR27770	187
1. Profil d'action de LPI3363 sur le cycle érythrocytaire	187
2. Rapidité d'action « killing rate »	188
3. Profil des courbes d'inhibition de croissance de P. falciparum 7G8	189
4. Activité in vitro vis-à-vis de souches de laboratoire multirésistantes	190
5. Propriétés pharmacocinétiques et métabolisme du dérivé LPI3363	191
6. Efficacité chez l'animal	194
F. Conclusion	195
Bibliographie du chapitre 3	197
Discussion et conclusion générale de l'étude.....	199
Bibliographie de la partie discussion et conclusion de l'étude	211

<u>Partie méthodologique</u>	213
A. <u>Synthèse bibliographique flavonoïdes et paludisme</u>	215
B. <u>Tests phénotypiques vis-à-vis de <i>P. falciparum</i></u>	215
1. <u>Culture de <i>P. falciparum</i></u>	215
i. <u>Souches plasmodiales</u>	215
ii. <u>Préparation des hématies</u>	216
iii. <u>« Milieu de Culture Malaria » ou MCM</u>	216
iv. <u>Décongélation de la souche et mise en culture</u>	216
v. <u>Frottis sanguin</u>	217
vi. <u>Division</u>	217
vii. <u>Congélation</u>	217
2. <u>Tests de chimiosensibilité de <i>Plasmodium</i></u>	217
i. <u>Réalisation des gammes de concentration des composés à tester</u>	217
ii. <u>Réalisation de la suspension parasitaire</u>	218
iii. <u>Quantification de la <i>Plasmodium</i> Lactate DésHydrogénase (pLDH)</u>	218
iv. <u>Détermination de la CI₅₀</u>	219
v. <u>Test d'inhibition de l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée</u>	219
vi. <u>Intérêt de combiner les deux techniques</u>	220
3. <u>Etude de combinaisons thérapeutiques selon la méthode des isobogrammes</u>	220
4. <u>Synchronisation des souches de <i>P. falciparum</i></u>	221
i. <u>Synchronisation au sorbitol : sélection des anneaux</u>	221
a. <u>Principe</u>	221
b. <u>Protocole</u>	221
ii. <u>Synchronisation au Percoll 70 % : sélection des schizontes</u>	222
a. <u>Principe</u>	222
b. <u>Protocole</u>	222
iii. <u>Synchronisation 0 - 3 heures</u>	222
5. <u>Ring-stage Survival Assay</u>	222
6. <u>Piperaquine Survival Assay</u>	223
7. <u>Evaluation de la chimiosensibilité des différents stades sanguins de <i>P. falciparum</i></u>	223
8. <u>Effet de MR27770 sur l'invasion</u>	224
9. <u>Evaluation de l'effet de MR27770 en milieu hyper- et hypotoniques</u>	224
i. <u>Milieu hypertonique (PBS)</u>	224
ii. <u>Milieu hypotonique (H₂O MilliQ)</u>	224
10. <u>Killing Rate</u>	225
11. <u>Sélection de mutants résistants par pression continue</u>	225

C. Voies métaboliques et mécanismes d'action investigués	226
1. Inhibition de la digestion de l'hémoglobine	226
i. Préparation des solutions nécessaires	226
ii. Réalisation de l'extrait protéique parasitaire	226
iii. Préparation de l'hémoglobine native	227
iv. Inhibition de l'hydrolyse de l'hémoglobine	227
v. Migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes	227
2. Inhibition de la lyse induite par le sorbitol	228
3. Evaluation de l'effet de MR27770 vis-à-vis de la voie du MEP (collaboration A. Hemmerlin, IBMP)	228
D. Mesure de cytotoxicité sur cultures cellulaires	229
1. Culture cellulaire de la lignée Hepa-1.6	229
2. Culture primaire de fibroblastes humains	229
3. Culture cellulaire de la lignée ThP1	230
4. Test de viabilité cellulaire au WST-8	230
5. Test de viabilité à la résazurine	231
E. Evaluation de la chimiosensibilité de <i>B. divergens</i>	231
F. Evaluation de la chimiosensibilité de <i>T. gondii</i>	231
G. Evaluation de l'activité antiplasmodiale <i>in vivo</i>	232
Bibliographie de la partie méthodologique	233
Annexe. Liste des publications et des communications scientifiques	235

Liste des figures

Figure 1. Espaces chimiques occupés par les produits naturels et les chimiothèques des gros groupes industriels ou publics.....	3
Figure 2. Pays où le paludisme est endémique en 2000 et 2016	8
Figure 3. Relation entre l'âge du sujet et la sévérité du paludisme en zone de transmission modérée .	11
Figure 4. Cycle de développement de <i>P. falciparum</i> chez l'homme et le moustique anophèle	13
Figure 5. Représentation schématique de l'infection des cellules hépatiques par la forme sporozoïte de Plasmodium	14
Figure 6. Processus actif de l'invasion du globule rouge par un mérozoïte de <i>Plasmodium</i>	16
Figure 7. Reconstitution 3D de la morphologie de <i>P. falciparum</i> au cours du cycle érythrocytaire d'après des coupes séquentielles obtenues en microscopie électronique à balayage	18
Figure 8. Evolution du volume du parasite et de la surface du globule rouge au cours du cycle érythrocytaire	19
Figure 9. Division de <i>Plasmodium</i> au sein de l'érythrocyte	20
Figure 10. Fréquence des fièvres induites par les différentes espèces de <i>Plasmodium</i>	22
Figure 11. Symptômes du paludisme sévère en fonction de l'âge	24
Figure 12. Historique du développement des antipaludiques et des résistances associées	31
Figure 13. Structure des alcaloïdes du quinquina.....	32
Figure 14. Structure des composés de la classe des amino-alcools.....	33
Figure 15. Chloroquine et ses dérivés 4-aminoquinoléine	35
Figure 16. Relation structure-activité antipaludique de la chloroquine.....	36
Figure 17. Mécanisme d'inhibition de la polymérisation de l'hème par la chloroquine	36
Figure 18. Métabolisme de l'amodiaquine.....	38
Figure 19. Structure des composés de la classe des 8-aminoquinoléines.....	41
Figure 20. Voie du pentose-phosphate	42
Figure 21. Inhibiteurs de la voie de synthèse de l'acide folique	43
Figure 22. Artémisinine et ses dérivés	45
Figure 23. Structure des principaux antibiotiques utilisés pour traiter le paludisme.....	49
Figure 24. Nouveaux antipaludiques en développement issus de nouvelles classes chimiques.....	51
Figure 25. Structure des flavonoïdes	54
Figure 26. Flavonoïdes naturels décrits dans la littérature et présentant une $CI_{50} \leq 1 \mu M$ vis-à-vis de <i>Plasmodium</i>	55
Figure 27. Flavonoïdes synthétiques ou hémisynthétiques décrits dans la littérature et présentant une $CI_{50} \leq 1 \mu M$ vis-à-vis de <i>Plasmodium</i>	56

Figure 28. Activités antipaludique et cytotoxique <i>in vitro</i> des différents flavonoïdes en fonction de leur classe et de leur origine	57
Figure 29. Ouverture du noyau chromène des flavonoïdes présentant des hydroxyles libres en position 5 et 7 du cycle A et 4' du cycle B	59
Figure 30. Activités antipaludique et cytotoxique <i>in vitro</i> des flavones et flavonols en fonction du type de substituants présents	59
Figure 31. Activité antipaludique <i>in vitro</i> des flavones et flavonols naturels en fonction de la nature de la substitution	61
Figure 32. Ratios des CI ₅₀ décrites dans la littérature sur des souches résistantes sur celles décrites sur les souches sensibles à la chloroquine pour les flavones et flavonols.....	63
Figure 33. Voie de biosynthèse des acides gras au sein de l'apicoplaste de <i>Plasmodium</i>	65
Figure 34. Composés les plus actifs décrits par Tasdemir <i>et al.</i> vis-à-vis des enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras de <i>Plasmodium</i>	65
Figure 35. Composé le plus actif sur l'enzyme <i>Pf</i> Ferredoxine-NADP ⁺ reductase décrit par Suwito <i>et al.</i> , 2014.....	66
Figure 36. Chaîne respiratoire mitochondriale de <i>Plasmodium</i> et ses inhibiteurs	67
Figure 37. Structures de la Licochalcone A et du composé ELQ-300 ciblant le complexe <i>bc₁</i> de la chaîne respiratoire mitochondriale de <i>Plasmodium</i>	68
Figure 38. Pore de transition de perméabilité mitochondriale.....	69
Figure 39. Structures de la génistéine et de la glabridine, deux isoflavonoïdes décrits pour induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène et mener à l'apoptose de <i>Plasmodium</i>	70
Figure 40. Coupes obtenues par microscopie électronique à transmission de promatigotes de <i>L. amazoniensis</i> non traités ou après traitement de 24 heures par 96 µM d'apigénine	70
Figure 41. Etapes de la digestion de l'hémoglobine par <i>P. falciparum</i> et enzymes impliquées.....	73
Figure 42. Composés flavonoïdiques les plus actifs de l'étude de Jin <i>et al.</i> , présentant une double inhibition des enzymes plasmepsine II et falcipaine-2.....	74
Figure 43. Schéma récapitulatif des cibles plasmodiales des flavonoïdes décrites dans la littérature ..	77
Figure 44. Structures de la lanaroflavone et de GB-1, biflavanone active <i>in vivo</i> dans un modèle murin de paludisme décrite par Konziase, 2015	80
Figure 45. Flavones et biflavonoïdes présents dans la chimiothèque patrimoine de l'UMR 7200 évalués biologiquement vis-à-vis de <i>P. falciparum</i> K1 dans le cadre de l'étude préliminaire de relation structure-activité.....	81
Figure 46. Contexte et résultats antérieurs à la thèse.	82
Figure 47. <i>Target candidate profiles</i> (TCPs) et <i>target product profiles</i> (TPPs) définis par MMV.....	99
Figure 48. Schéma réactionnel permettant l'obtention de MR27770 en 4 étapes.....	102
Figure 49. Représentation 3D du composé MR27770 obtenue à partir du site molinspiration.....	103
Figure 50. Profil d'action du composé MR27770 lors du cycle érythrocytaire	104

Figure 51. Activité de MR27770 à 2,5 et 5 μ M aux stades anneau vs trophozoïte et schizonte	105
Figure 52. Activité métabolique de <i>P. falciparum</i> non traité en fonction du stade de développement parasitaire	106
Figure 53. Action des médicaments existants durant le cycle érythrocytaire de <i>P. falciparum</i>	107
Figure 54. « Killing rate ».....	108
Figure 55. Corrélacion entre la capacité du parasite à résister à une pulse de 6 heures de 880 nM de dihydroartémisine et la présence d'une mutation du gène <i>kelch13</i>	112
Figure 56. Corrélacion entre la capacité du parasite à résister à une pulse de 48 heures de 200 nM de pipéraqune et la présence d'une mutation du gène <i>kelch13</i> et du nombre de copies du gène <i>pfmdr1</i>	113
Figure 57. Activité de la méfloquine en fonction du nombre de copies du gène <i>pfmdr1</i> de la souche de <i>P. falciparum</i>	113
Figure 58. Effet de MR27770 et de la dihydroartémisinine sur les souches sensibles ou résistantes à l'artémisinine présentant d'une mutation du gène <i>kelch13</i>	114
Figure 59. Corrélacion entre l'effet de 5 μ M de MR27770 et l'effet de 880 nM de DHA	115
Figure 60. Courbe d'inhibition obtenue pour la souche 6349 après traitement de 6 heures par des concentrations croissantes de MR27770 +/- une concentration fixe de dihydroartémisinine	115
Figure 61. Courbe d'inhibition obtenue pour la souche 6298 après traitement de 6 heures par des concentrations croissantes de MR27770 +/- une concentration fixe de dihydroartémisinine	116
Figure 62. Courbe d'inhibition obtenue pour la souche 6270 après traitement de 6 heures par des concentrations croissantes de MR27770 +/- une concentration fixe de dihydroartémisinine	117
Figure 63. Corrélacion entre la capacité du parasite à résister à une pulse de 6 heures de 5 μ M de MR27770 et la présence d'une mutation du gène <i>kelch13</i> et du nombre de copies du gène <i>pfmdr1</i> ...	118
Figure 64. Activité de MR27770 en fonction du nombre de copies du gène <i>pfmdr1</i>	119
Figure 65. Activité de MR27770 en fonction du statut de résistance à l'amodiaquine.....	119
Figure 66. Régression linéaire entre l'effet de MR27770 et la CI_{50} de la méfloquine vis-à-vis d'isolats sensibles et résistants à la méfloquine	120
Figure 67. Régression linéaire entre l'effet de MR27770 et la CI_{50} de la déséthylamodiaquine	120
Figure 68. Parasitémie observée en fonction du temps après la mise sous pression de trois cultures d'un même clone de <i>P. falciparum</i> W2 (clone D11) avec 5 x la CI_{50} de MR27770	121
Figure 69. Concentration plasmatique après injection i.v., i.p. ou p.o. du composé MR27770 chez la souris	123
Figure 70. Structures de la tangéretine et de la nobilétine.....	124
Figure 71. Activité <i>in vivo</i> de MR27770 et de la chloroquine obtenue sur des souris Swiss infectées par 2.10 ⁶ globules rouges infectés par <i>P. berghei</i> ANKA.....	125
Figure 72. Phénotype induit après 3 heures de traitement d'une culture asynchrone par 10 μ M de MR27770 ou par du milieu de culture contenant la même quantité de DMSO	136

Figure 73. Phénotype observé en fonction du temps d'incubation d'anneaux âgés de 0 à 3 heures avec 10 μ M de MR27770 ou avec du milieu de culture contenant la même quantité de DMSO.....	136
Figure 74. Phénotype observé à J4 sur les frottis de souris infectées par <i>P. berghei</i> ANKA et traitées par MR27787 ou par le solvant de dilution	137
Figure 75. Phénotype observé après traitement d'une culture de <i>Babesia divergens</i> pendant 72 heures avec une concentration représentant environ 2 x CI ₅₀ de MR27770.	137
Figure 76. Parasitémie mesurée après traitement de 3 heures en milieu hypertonique	138
Figure 77. Phénotype observé après traitement de 3 heures en milieu hypertonique.....	139
Figure 78. Parasitémie mesurée après traitement de 3 heures en milieu hypotonique	139
Figure 79. Phénotype observé après traitement de 3 heures en milieu hypotonique.....	140
Figure 80. Pourcentage de globules rouges infectés par des schizontes résiduels, des anneaux (« rings » vacuolisés ou non) ou d'hématies où le mérozoïte est lié mais n'a pas encore envahi l'hématie	141
Figure 81. Phénotype observé lors de l'étude de l'effet de MR27770 lors du processus d'invasion....	142
Figure 82. Pourcentage de globules rouges infectés par des schizontes résiduels, des anneaux (« rings » vacuolisés ou non) ou d'hématies où le mérozoïte est lié mais n'a pas encore envahi l'hématie	142
Figure 83. Isobogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et la dihydroartémisinine.	143
Figure 84. Isobogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et la chloroquine.....	144
Figure 85. Isobogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et la méfloquine	145
Figure 86. Isobogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et l'atovaquone.....	145
Figure 87. Isobogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et la pyriméthamine	146
Figure 88. Nombre de parasites <i>P. yoelii</i> détectés par cellule HepG2CD81 infectée en fonction du traitement appliqué	146
Figure 89. Taille des parasites <i>P. yoelii</i> infectant des cellules HepG2CD81 en fonction du traitement appliqué	147
Figure 90. Nombre de parasites <i>P. berghei</i> détectés par hépatocyte primaire de singe <i>Macaca fascicularis</i> infecté en fonction du traitement appliqué.....	147
Figure 91. Taille des parasites <i>P. berghei</i> infectant des hépatocytes primaires de singe <i>Macaca fascicularis</i> en fonction du traitement appliqué	148
Figure 92. Mélange protéique de <i>Plasmodium</i> et d'hémoglobine en présence ou en absence de MR27770.....	151
Figure 93. Inhibition de la lyse induite par le sorbitol par quelques dérivés de la lanaroflavone.	152
Figure 94. Principe du screening phénotypique permettant de mettre en évidence des inhibiteurs de la voie du MEP ou de la prenyl-transférase et résultats obtenus pour MR27770 testé à 100 μ M.....	154
Figure 95. Schéma représentant les deux façons de considérer la lanaroflavone.....	161

Figure 96. Schéma réactionnel mettant en jeu un précurseur iodé permettant d'obtenir les flavones substituées en position 8.....	162
Figure 97. Etude topologique autour du composé MR27770.....	166
Figure 98. Pharmacophore partiel résultant de l'évaluation de l'importance des groupements méthoxyles en position 5 et 7 du cycle A et des substitutions du cycle B	168
Figure 99. Pharmacophore partiel issu de l'étude de l'importance de la liaison alcyne et de l'homologation de la chaîne carbonée en position 8.....	172
Figure 100. Pharmacophore partiel représentant l'effet de la cyclisation de l'azote.....	175
Figure 101. Effet de la concentration de LPI3322 sur la croissance parasitaire après 72 heures d'incubation	178
Figure 102. Pharmacophore partiel représentant l'effet de la substitution de l'alcyne par un cycle ...	179
Figure 103. Pharmacophore de la série 4'-O-benzyle.....	186
Figure 104. Pharmacophore issu de l'étude de relation structure-activité des dérivés de la Lanaroflavone.....	187
Figure 105. Profil d'action du composé LPI3363 lors du cycle érythrocytaire.....	188
Figure 106. « Killing rate » des analogues de flavone et des substances de référence.	188
Figure 107. Allure des courbes d'inhibition de MR27770 et de trois de ses dérivés LPI3279, LPI3363 et LPI3364	189
Figure 108. Activité de MR27770, de ses analogues et de différents médicaments de référence vis-à-vis de trois souches de laboratoire multirésistantes.....	190
Figure 109. Activité de sept dérivés de la lanaroflavone vis-à-vis de la souche sensible NF-54 et de la souche multi-résistante K1	191
Figure 110. Concentration plasmatique après injection i.v., i.p. ou p.o. du composé LPI3363 chez la souris	192
Figure 111. Aires sous la courbe du composé LPI3363 et de son métabolite déprotégé, le composé LPI3364, après administration <i>per os</i> chez la souris de 10 et 50 mg/kg de LPI3363	193

Liste des tableaux

Tableau 1. Critères de gravité du paludisme à <i>P. falciparum</i> définis par l'OMS.....	24
Tableau 2. Analyse de l'association du facteur activité ($CI_{50} \leq 10$) au facteur "type de substitution" pour les flavones et flavonols.....	61
Tableau 3. Activités biologiques du composé MR27770 vis-à-vis de différentes souches de <i>P. falciparum</i> et de différentes lignées cellulaires.....	103
Tableau 4. Paramètres issus de l'expérience de <i>killing rate</i> pour MR27770 et trois médicaments de référence ayant des rapidités d'action différentes : chloroquine, artémisinine et atovaquone	109
Tableau 5. Rapidité d'action ou « <i>Killing rate</i> » de composés tête-de-série antipaludiques décrite dans la littérature et déterminées selon le protocole de Sanz <i>et al.</i> , 2012.....	109
Tableau 6. Résistances associées aux isolats cliniques cambodgiens de <i>P. falciparum</i> utilisés pour déterminer l'activité de MR27770	111
Tableau 7. Résistances associées à l'isolat 4912 de <i>P. falciparum</i> et aux souches obtenues par génétique inverse utilisés pour déterminer l'activité de MR27770.....	118
Tableau 8. Inhibition des cytochromes P450 par le composé MR27770	122
Tableau 9. Paramètres pharmacocinétiques mesurés chez la souris pour MR27770	123
Tableau 10. Tableau récapitulatif des propriétés du composé tête-de-série MR27770 par rapport aux prérequis MMV pour un composé <i>Target Candidate Profile 1</i>	127
Tableau 11. Activités mesurées vis-à-vis de trypanostigotes de <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> STIB900, d'amastigotes axéniques de <i>Leishmania donovani</i> , d'une culture asynchrone de stades sanguins de <i>Plasmodium falciparum</i> K1 et de cellules L6 pour cinq dérivés MR.....	149
Tableau 12. Activités mesurées vis-à-vis de tachyzoïtes de <i>Toxoplasma gondii</i> RH- <i>Aku80</i> -YFP-luc, de trophozoïtes de <i>Babesia divergens</i> , de stades sanguins de <i>Plasmodium falciparum</i> 7G8 et de fibroblastes humains en culture primaire pour trois dérivés MR	150
Tableau 13. Activité de certains dérivés MR vis-à-vis de kinases humaines, de <i>Leishmania</i> et de <i>Plasmodium</i>	153
Tableau 14. Activités antipaludiques et cytotoxiques des composés de référence.....	164
Tableau 15. Importance des O-méthyles en position 3' et 4' du cycle B	167
Tableau 16. Effet de la suppression des méthoxyles en position 5 et 7 du cycle A dans la série 3',4'-diméthoxy.....	168
Tableau 17. Influence de l'atome d'azote en position 8.....	169
Tableau 18. Effet de la saturation de l'alcyne, de la basicité et/ou de l'homologation de la chaîne en position 8	170
Tableau 19. Effet de la cyclisation de l'amine en position 8	173
Tableau 20. Rigidification de la position de l'azote.....	175

Tableau 21. Dérivés de flavone substitués en position 7 issus de la chimiothèque du CERMN	179
Tableau 22. Série 4'-O-benzyle.....	183
Tableau 23. Activités des composés 8-benzo dont le cycle B est non substitué ou substitué par des méthoxyles en position 3' et 4'.....	184
Tableau 24. Paramètres issus de l'expérience <i>killig rate</i> pour LPI3363, MR27770 et trois médicaments de référence ayant des rapidités d'action différentes : chloroquine, artémisinine et atovaquone.	189
Tableau 25. Inhibition des cytochromes P450 par le composé LPI3363 et la référence MR27770....	191
Tableau 26. Paramètres pharmacocinétiques mesurés chez la souris pour le composé LPI3363	192
Tableau 27. Activité <i>in vivo</i> de trois dérivés de la lanaroflavone obtenue sur des souris Swiss infectées par 2.10^6 globules rouges infectés par <i>P. berghei</i> ANKA.....	194
Tableau 28. Concentrations utilisées pour évaluer l'effet de combinaisons entre MR27770 et la dihydroartémisinine, la chloroquine, la méfloquine, l'atovaquone et la pyriméthamine.....	221

Liste des abréviations

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADAMTS13	<i>disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
AMA-1	<i>apical membrane antigen 1</i>
AQ	amodiaquine
AQ-R	amodiaquine-résistant
AQ-S	amodiaquine-sensible
ARN	acide ribonucléique
ART	artémisinine
ATP	adénosine triphosphate
ATVQ	atovaquone
AUC _{0-inf}	aire sous la courbe entre le temps 0 et extrapolée à un temps infini
BOC	<i>t</i> -butoxycarbonyle
BS (sites)	sites de liaison de la <i>zinc finger nuclease</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSmut	souche mutée comprenant des sites BS
C ₀	concentration plasmatique initiale
CDK5	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>
CERMN	centre de recherche sur le médicament en Normandie
CHI	<i>chromatographic hydrophobicity index</i>
CI ₅₀	concentration inhibitrice 50
CIMI	centre d'immunologie et des maladies infectieuses
CK1	<i>casein kinase 1</i>
Cl	clairance plasmatique
CLK1	<i>CDC like kinase 1</i>
C _{max}	concentration plasmatique maximale
CMC	carboxyméthylcellulose
cpm	coups par minute
CQ	chloroquine
CQ-diP	chloroquine diphosphate
CSA	chondroïtine-sulfate A
CTA	combinaison thérapeutique à base d'artémisinine

CYP	cytochrome P450
DEAQ	déséthylamodiaquine
deAQ	déséthylamodiaquine
DEX	dexaméthasone
DHA	dihydroartémisinine
DHFR	dihydrofolate réductase
DHODH	dihydroorotate déshydrogénase
DHPS	dihydroptéroate synthétase
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
dTMP	désoxythymidilate
DYRK1A	<i>dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i>
EBL	<i>erythrocyte binding-like proteins</i>
EFS	établissement français du sang
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELQ	<i>endochin-like quinolone</i>
F	biodisponibilité
FabG	β -acétoacyle-ACP-réductase
FabI	énoyl-ACP-réductase
FabZ	β -hydroxyacyle-ACP-déshydratase
Fd	ferredoxine
FIC	IC ₅₀ fractionnelle
Fol	farnésol
FR	fréquence relative
G6PD	glucose-6-phosphate déshydrogénase
G6PDd	déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GGol	géranylgéraniol
GRP	globules rouges parasités
GRS	globules rouges sains
GSH	glutathion réduit
GSK-3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
GSSG	glutathion oxydé
H ⁺ -ATPase	pompe à protons

HAL	halofantrine
Hb	hémoglobine
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
hERG	canaux potassiques <i>human ether-a-go-go-related gene</i>
HSPGs	<i>heparan-sulfate proteoglycans</i>
i.m	intramusculaire
i.p.	intrapéritonéal
i.v.	intraveineux
IBMC	institut de biologie moléculaire et cellulaire
IBMP	institut de biologie moléculaire des plantes
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IPC	Institut Pasteur du Cambodge
IPPTS	institut de parasitologie et de pathologie tropicale de strasbourg
IS	indice de sélectivité
J	jour
K13	<i>kelch13</i>
KAHRP	<i>knob-associated histidin-rich protein</i>
KARMA	<i>K13 Artemisinin Resistance Multicenter Assessment</i>
LogD	coefficient de partage octanol/eau
LUM	luméfantrine
MCM	milieu de culture malaria
MDR CN	nombre de copies du gène <i>pfmdr1</i>
MEP	méthylérythriol phosphate
MESA	<i>mature parasite-infected erythrocyte surface antigen</i>
milli-Q	système de filtration <i>Millipore Corporation</i> ®
MMV	<i>medicine for malaria venture</i>
MQ	méfloquine
MSP	<i>merozoïte Surface Protein</i>
MTT	<i>thiazolyl blue tetrazolium</i>
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	monoxyde d'azote
NPP	<i>new permeability pathways</i>
OH	hydroxyle
OMe	O-méthyle
OMS	organisation mondiale de la santé

PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCT	<i>parasite clearance time</i>
PDP	<i>product development partnership</i>
Pdtx	podophyllotoxine
PEG	polyéthylène glycol
<i>Pf</i>	<i>P. falciparum</i>
<i>pfap2mu</i>	gène de <i>Plasmodium</i> candidat comme marqueur de résistance à l'artémisinine en Afrique, dont la fonction n'est pas connue
<i>PfATP4</i>	canal sodique de la membrane de <i>Plasmodium</i>
<i>pfcarl</i>	<i>P. falciparum cyclic amine resistance locus</i>
<i>pfcr1</i>	<i>P. falciparum chloroquine-resistance transporter</i>
<i>PfEMP</i>	<i>P. falciparum erythrocyte membrane protein</i>
<i>PfFNR</i>	<i>P. falciparum ferredoxin reductase</i>
<i>PfFNT</i>	cotransporteur lactate-H ⁺
<i>pfmdr1</i>	<i>P. falciparum multidrug resistance protein 1 gene</i>
<i>pfmhe-1</i>	<i>P. falciparum Na⁺/H⁺ exchanger gene</i>
<i>PfPI3K</i>	protéine phosphatidylinositol-3-kinase de <i>Plasmodium</i>
<i>PfRh</i>	protéine de rhoptrie de <i>P. falciparum</i>
<i>pfubp1</i>	<i>P. falciparum ubiquitin binding protein 1 gene</i>
PI	phosphatidylinositol
PI3P	phosphatidylinositol-3-phosphate
PIB	produit intérieur brut
PIP ou PPQ	pipéraquline
pLDH	<i>Plasmodium</i> lactate déshydrogénase
PMI	initiative présidentielle américaine contre le paludisme
pNHDF	<i>primary normal human dermal fibroblast</i>
PPQ-R	pipéraquline-sensible
PPQ-S	pipéraquline-résistant
PRR	<i>parasite reduction rate</i>
PSA	<i>piperaquine survival assay</i>
QN	quinine
RBL	<i>reticulocyte binding-like proteins</i>
RESA	<i>Ring infected erythrocyte surface antigen</i>
RON	<i>rhoptry neck protein</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>

RPMI	<i>roswell park memorial institute</i>
RSA	relation structure-activité
RSA	<i>ring-stage survival assay</i>
SAGM	<i>saline adenine glucose medium</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium
SNP	single nucleotide polymorphism
SVFI	sérum fœtal de veau inactivé
T _{1/2}	demi-vie plasmatique
TCP	<i>target candidate profile</i>
THPI	<i>tropical and public health institute</i>
T _{max}	temps où la concentration plasmatique maximale est atteinte
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TPP	<i>target product profile</i>
TRAP	<i>thrombospondin-related anonymous protein</i>
TVN	<i>tubovesicular network</i>
Vd _{ss}	volume de distribution à l'équilibre (<i>steady state</i> , temps extrapolé à l'infini)
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VP	valeur pronostique
WT	<i>wild type</i>
Δ	gène muté

Introduction générale

Introduction générale

Le paludisme est un facteur de mortalité important qui impacte d'avantage l'économie des pays en voie de développement. C'est un réel problème de santé publique notamment en Afrique subsaharienne où ont lieu 90% des 438 000 décès dénombrés au niveau mondial en 2016. Les traitements disponibles sont plus ou moins bien tolérés et sont sujets à des phénomènes de résistances. Le Cambodge, épiceutre des résistances aux antipaludiques a connu l'émergence récente de parasites présentant une sensibilité diminuée à l'artémisinine, médicament le plus efficace actuellement, qui s'est diffusée aux pays alentours. Il est donc urgent de développer de nouveaux traitements présentant une activité conservée vis-à-vis de ces souches et dans l'idéal, présentant un mécanisme d'action original.

Les stratégies de screening de grandes bibliothèques de composés chimiques se sont avérées peu fructueuses, recoupant des classes de composés connus et redondants. Les produits naturels représentent une source importante de nouveaux composés et couvrent un espace chimique laissé vacant par les chimiothèques de produits synthétiques (**Figure 1**).

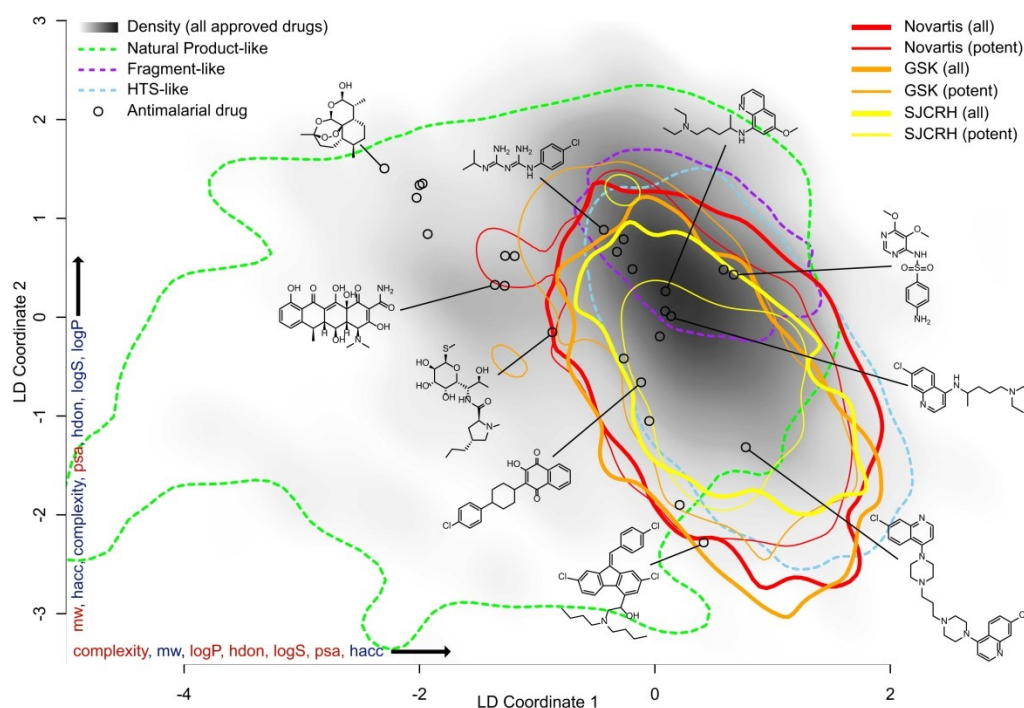


Figure 1. Espaces chimiques occupés par les produits naturels (vert) et les chimiothèques des gros groupes industriels ou publics (tons de rouge à jaune). Les principaux antipaludiques sont représentés dans cet espace. D'après Guiguemde *et al.*, 2012¹. LD = analyse Linéaire Discriminante des caractéristiques physicochimiques des hits validés ; HTS = High Throughput Screening ; GSK = GlaxoSmithKline ; SJCRH = St. Jude Children's Research Hospital

¹ Guiguemde, W.A., Shelat, A.A., Garcia-Bustos, J.F., Diagana, T.T., Gamo, F.-J., and Guy, R.K. (2012). Global phenotypic screening for antimalarials. *Chem. Biol.* 19, 116–129.

Deux antipaludiques majeurs, la quinine et l'artémisinine, sont des molécules d'origine végétale qui ont été découvertes par l'approche rationnelle de leur utilisation en médecine traditionnelle. L'isolement de l'artémisinine par le Dr Tu Youyou a d'ailleurs fait l'objet du prix Nobel de médecine en 2015.

Ces travaux de thèse portent sur une nouvelle série de composés antipaludiques inspirés d'un biflavonoïde naturel isolé d'un arbre colombien, la lanaroflavone. Cette molécule originale présente une activité submicromolaire vis-à-vis de *P. falciparum in vitro* mais n'est malheureusement pas active chez l'animal impaludé. Notre hypothèse est que le métabolisme rapide de ce composé *in vivo* le rend inactif. La synthèse de dérivés optimisés et métaboliquement stables, sous la forme de flavones substituées en positions clés, a donc été réalisée et fait l'objet de ces travaux de thèse.

La partie introductive de ce manuscrit aura pour but de définir le cadre de l'étude. Nous introduirons dans une première partie l'épidémiologie, le cycle parasitaire et la physiopathologie du paludisme. Nous préciserons ensuite les traitements disponibles et en phase de développement clinique liés à cette maladie. Enfin un état de l'art concernant les flavonoïdes et leur activité antiplasmodiale sera présenté et mènera à l'introduction du contexte et des objectifs de la thèse.

Le cœur du manuscrit sera divisé en trois chapitres qui traiteront des résultats obtenus lors de cette thèse. Dans le premier chapitre les atouts pharmacologiques du composé chef-de-file de cette nouvelle série chimique seront exposés. Le deuxième chapitre traitera de l'exploration du mécanisme d'action des dérivés de la lanaroflavone et un dernier chapitre sera consacré à l'étude de relation structure-activité mise en place pour optimiser l'activité du composé chef-de-file.

Les résultats obtenus seront discutés dans une dernière partie afin de conclure l'étude. La partie méthodologique est disponible à la fin de ce manuscrit.

L'ensemble des résultats obtenus sont confidentiels et font l'objet d'un dépôt de brevet dans le cadre d'une phase de prématuration avec la SATT-Conectus Alsace. Les publications scientifiques issues de l'étude seront soumises de façon concomitante au dépôt de brevet.

Etat de l'art et contexte de l'étude

Etat de l'art et contexte de l'étude

Le paludisme est la 3ème cause de mortalité par maladie infectieuse après le VIH et la tuberculose. Cette maladie concerne près de la moitié de la population mondiale — essentiellement la zone intertropicale — et a causé près de 438.000 décès en 2015 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'Afrique est le continent le plus touché avec près de 90% des décès, essentiellement en zone subsaharienne. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont les personnes les plus à risque dans ces zones d'endémies.

Le paludisme est dû à un parasite Apicomplexe du genre *Plasmodium* et est transmis à l'homme lors d'une piqûre par un moustique du genre *Anopheles*. Chez l'homme, le parasite effectue un cycle complexe qui a lieu tout d'abord dans le foie puis dans le sang où il infecte les hématies. C'est lors de ce cycle érythrocytaire qu'apparaissent les symptômes de type fièvre, sueurs, frissons, anémie et, dans les cas les plus graves, une défaillance multi-viscérale ou un coma qui mènent souvent au décès de l'individu.

Le traitement du paludisme repose actuellement sur une classe thérapeutique : les dérivés de l'artémisinine. Ces médicaments diminuent rapidement la charge parasitaire mais sont aussi rapidement éliminés du sang. L'OMS recommande donc l'utilisation de ces composés en association avec un médicament partenaire qui aura une action moins rapide mais plus longue afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique et de limiter l'apparition de résistances. C'est le cas de la méfloquine, la luméfantrine, la pipéraquline, l'amodiaquine et l'association sulfadoxine-pyriméthamine.

En 2008 des résistances aux dérivés de l'artémisinine ont été décrites au Cambodge (Noedl *et al.*, 2008). Depuis, la mise en évidence du marqueur moléculaire de résistance *kelch13* (Straimer *et al.*, 2015) a permis le suivi de la propagation : des cas de résistances aux dérivés de l'artémisinine ont déjà été détectés à la frontière entre l'Inde et le Myanmar (Tun *et al.*, 2015). De plus, des cas d'échecs thérapeutiques à l'association artémether-luméfantrine de patients de retour d'Angola, du Libéria ou d'Ouganda ont récemment été mis en évidence, ce qui pourrait refléter une diffusion, ou plus vraisemblablement, une émergence de mutants résistants dans ces régions. En effet les mutations du gène *kelch13* mises en évidence sont situées plus en amont du gène que celles constatées en Asie et sont associées à des mutations du gène *pfap2mu* et/ou *pfubp1* (Sutherland *et al.*, 2017). Le nombre d'échecs thérapeutiques est en augmentation dans la région du grand Mékong et il devient urgent de remplacer les médicaments actuels par de nouvelles combinaisons, efficaces sur les souches multi-résistantes de *P. falciparum*.

A. Eléments généraux sur le paludisme et *Plasmodium*

1. Données épidémiologiques

Cinq espèces de *Plasmodium* sont capables de parasiter l'homme : *P. falciparum*, espèce considérée comme la plus dangereuse, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et le parasite simien *P. knowlesi*. Le paludisme sévit encore dans toute la région Sud du globe, essentiellement dans la région intertropicale. Des progrès substantiels ont été réalisés depuis les années 2000 où la mise en place d'un plan de lutte contre cette maladie par l'OMS a permis d'éliminer le paludisme dans 17 pays, c'est-à-dire de réduire à zéro le nombre de cas autochtones pendant au moins 3 ans (**Figure 2**). De plus, le nombre de cas de paludisme a été réduit de 41% et la mortalité de 62% sur la même période (2000-2015). Malgré ces efforts, le paludisme est toujours endémique dans 91 pays et continue d'avoir un impact dévastateur sur la vie des habitants et sur l'économie de ces pays. Les dernières estimations indiquent que 212 millions de cas ont été recensés en 2015, menant à 429 000 décès, la plupart chez les enfants africains de moins de 5 ans (*World Malaria Report, 2016, OMS*).

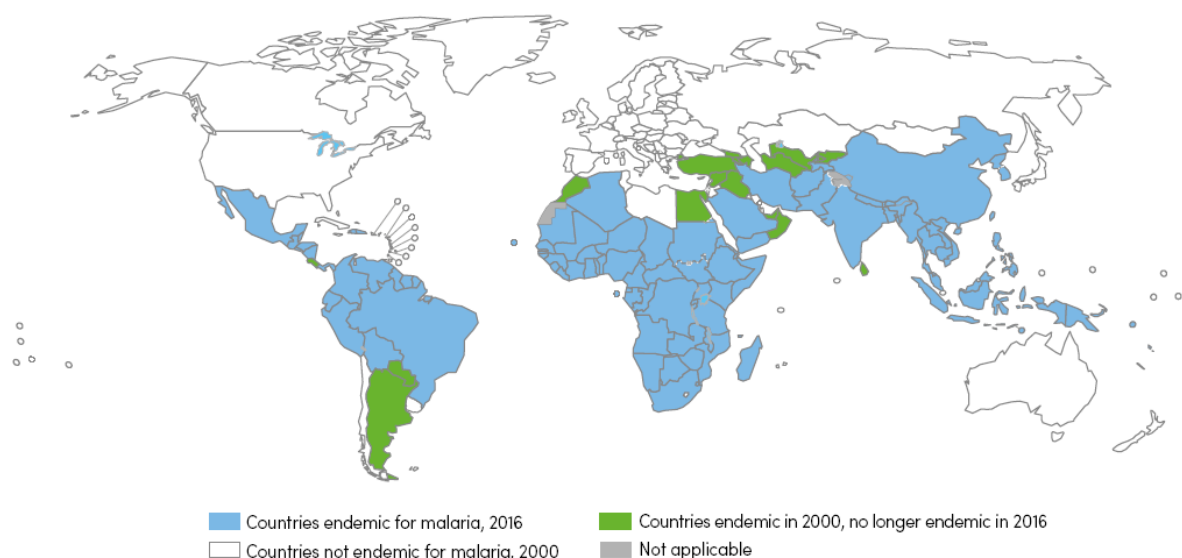


Figure 2. Pays où le paludisme est endémique en 2000 et 2016. Les pays ne présentant pas de cas autochtones pendant trois années consécutives sont considérés comme ayant éliminé le paludisme. Source : *World Malaria Report 2016, WHO*.

i. Chiffres clés

- Prévalence parasitaire

En Afrique subsaharienne, région la plus touchée par le paludisme, le nombre de patients atteints de paludisme aurait diminué de 131 millions en 2010 à 114 millions en 2015. Le taux d'infection est plus élevé chez les enfants de 2 à 10 ans.

- Incidence des cas

En 2015, 90% des cas de paludisme ont été enregistrés dans la *région Afrique* de l'OMS, loin devant la *région Asie du Sud-Est* (7%) et la *région Méditerranée orientale* (2%). Les infections à *P. vivax* représentent environ 4% des cas de paludisme dans le monde, sans compter l'*Afrique*, cette proportion atteint 41%.

- Mortalité

En 2015, la plupart des décès sont survenus dans la *région Afrique* (92%) loin devant la *région Asie du Sud-Est* (6%) et la *région Méditerranée orientale* (2%). La grande majorité des décès sont dus à *P. falciparum* (99%). Les infections à *P. vivax* seraient à l'origine de 3100 décès en 2015, dont 86% hors Afrique. 70% des décès concernaient les enfants de moins de 5 ans, le paludisme étant toujours une des principales causes de mortalité infantile. Néanmoins, grâce au plan de lutte de l'OMS, 6,8 millions de décès dus au paludisme ont été évités entre 2001 et 2015, dont 97% concernent les enfants de moins de 5 ans.

- Élimination

La transmission du paludisme n'est réapparue dans aucun des 17 pays ayant éliminé la maladie entre 2000 et 2015. L'objectif de l'OMS à 2020 est d'éliminer le paludisme dans 10 pays additionnels. En 2015, 10 pays et territoires ont recensé moins de 150 cas autochtones et neuf autres pays entre 150 et 1000 cas ce qui semble plutôt encourageant.

- Augmentation de l'espérance de vie et des conditions économiques

L'espérance de vie à la naissance aurait augmenté de 1,2 an dans la *région Afrique* de l'OMS. En Afrique subsaharienne, l'espérance de vie est passée de 50,6 ans en 2000 à 60 ans en 2015. La baisse du risque de mortalité due au paludisme entre 2000 et 2015 peut être valorisée à 1 810 milliards de dollars US dans la région Afrique, soit 44% du produit intérieur brut des pays affectés en 2015. Au niveau mondial, cela représente 2 040 milliards de dollars soit 3,6% du total du PIB des pays affectés.

ii. Influence du vecteur : l'anophèle femelle

Les principaux facteurs liés à l'intensité de la transmission du paludisme sont la densité de population, la longévité, le comportement et l'efficacité du moustique vecteur. Seulement 25 des plus de 400 espèces d'anophèles sont de bons vecteurs. Les plus efficaces survivent longtemps et tolèrent les changements environnementaux, sont présents en forte densité en climat tropical, se reproduisent facilement et piquent préférentiellement l'homme (anthropophiles). C'est le cas d'*Anopheles gambiae* en Afrique. La reproduction des anophèles exige du sang, de l'eau et de la chaleur. La femelle fécondée ne peut pondre qu'après un repas sanguin (chez l'homme ou l'animal), menant au développement rapide de ses follicules ovariens puis à la ponte. L'intervalle entre le repas sanguin et

la ponte est appelé cycle gonotrophique et dure de 48 à 72 heures en moyenne en zone tropicale. Les gîtes de ponte varient en fonction de l'espèce d'anophèle mais nécessitent la présence d'eau pendant au moins 8 jours dans les pays tropicaux pour que les œufs puissent se transformer en larves puis en nymphes et donner ensuite une nouvelle génération d'adultes (ou imago). Ce cycle aquatique peut durer plus d'un mois en zone tempérée. La chaleur et l'humidité conditionnent également l'activité génitale des femelles : en zone tempérée les anophèles ne pondent que pendant la saison chaude, en zone équatoriale, chaude et humide, l'activité est permanente alors qu'en zone tropicale, la saison sèche limite le nombre de gîtes larvaires et de ce fait la population de moustiques. Ainsi, en zone intertropicale où les moustiques sont présents toute l'année, la transmission du paludisme est dite stable, en zone sub-tropicale et tempérée la transmission est dite instable et n'est possible qu'à la saison chaude en fonction de l'hygrométrie. Les femelles vivent au maximum un mois, tandis que le mâle meurt rapidement après la fécondation. Certaines espèces sont plutôt endophiles (vivent à l'intérieur des habitations) d'autres plutôt exophiles et ces moustiques ont une activité essentiellement crépusculaire. Néanmoins, avec la généralisation de l'utilisation de moustiquaires imprégnées distribuées aux populations, il a été observé un changement de comportement des moustiques qui ont tendance à piquer plus tôt dans la soirée, avant la tombée de la nuit (Gentilini, 2012).

Dans la plupart des pays d'Asie et d'Amérique du Sud, où la transmission est plutôt faible et saisonnière, *P. falciparum* et *P. vivax* ont approximativement la même prévalence. Dans ces zones, la plupart des personnes se font piquer moins d'une fois par an par un moustique impaludé. L'intensité de transmission est beaucoup plus élevée en Afrique sub-saharienne où *P. falciparum* est majoritaire et dans certaines îles d'Océanie : le taux d'inoculation peut atteindre 1000 piqûres infestantes/an dans certaines zones. Dans ces endroits, la morbidité et la mortalité dues au paludisme sont beaucoup plus élevées chez l'enfant, mais la plupart des infections sont asymptomatiques chez l'adulte (Gentilini, 2012; White *et al.*, 2014a).

iii . Influence de l'hôte

En zone d'endémie, les individus développent une immunité partielle à la maladie, aussi appelée prémunition ou immunité sergent. Cette immunité est labile si l'individu quitte la zone d'endémie pendant plus de 18 mois et est spécifique d'une région. Elle s'acquiert progressivement en situation d'exposition continue et est non stérilisante : les sujets sont toujours infectés par le parasite mais sont asymptomatiques, ce qui complique les stratégies d'élimination dans ces zones (**Figure 3**). La réponse immunitaire fait appel à une réponse cellulaire et humorale souche-spécifique qui doit constamment s'adapter à la variation antigénique du parasite. C'est l'exposition à de nombreuses souches au cours du temps qui permettra la prémunition. En zone d'endémie la protection materno-transmise disparaît vers l'âge de 4 mois.

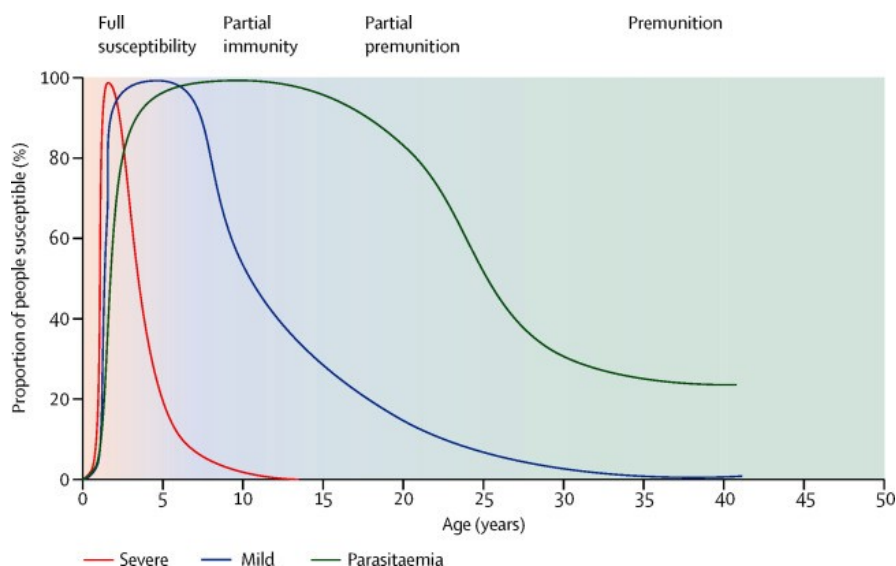


Figure 3. Relation entre l'âge du sujet et la sévérité du paludisme en zone de transmission modérée. Lors d'expositions répétées et continues, le sujet acquiert une prémunition, tout d'abord à la forme sévère du paludisme (*severe*), ensuite aux symptômes (*mild*) puis, de façon beaucoup plus lente, à la détectabilité microscopique du parasite (*parasitaemia*). D'après White *et al.*, 2014a

De plus, certaines populations présentant des hémoglobinopathies sont plus ou moins prémunies vis-à-vis du paludisme. Aucune maladie infectieuse n'a façonné le génome humain comme l'a fait le paludisme. En effet, la distribution géographique de la drépanocytose, des hémoglobinoses C et E, de l'ovalocytose, des thalassémies et du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) sont similaires à celle du paludisme avant la mise en place de mesures de contrôle. Ces maladies confèrent un avantage sélectif en zone palustre. Dans le cas de la drépanocytose (ou hémoglobine S), le sujet hétérozygote est protégé du paludisme symptomatique tandis que l'homozygote développe la drépanocytose. Les mécanismes de protection impliquent une diminution de la croissance du parasite dans de faibles pressions d'oxygène (hémoglobine AS), une cytoadhérence réduite (hémoglobines AS, AC et CC), une invasion réduite (ovalocytose), une densité parasitaire réduite (déficit en G6PD) et une multiplication réduite en cas de forte densité parasitaire (hémoglobine AE) (White *et al.*, 2014a).

iv . Influence du parasite

- *Plasmodium falciparum*

C'est l'espèce la plus redoutable mais aussi la plus largement répandue. Elle est uniquement présente dans les régions chaudes, le développement du cycle chez le moustique (sporogonie) nécessitant des températures supérieures à 18 °C. Chez l'homme, la période d'incubation dure 7 à 15 jours. *P. falciparum* parasite toutes les hématies quel qu'en soit l'âge et peut induire des parasitémies de plus de 10 %. C'est précisément sur cette espèce que porteront nos travaux.

- *Plasmodium vivax*

Cette espèce, bien que moins répandue que *P. falciparum*, se rencontre toutefois du 37° degré de latitude Nord au 25° degré de latitude Sud. La période d'incubation dure de 15 jours à 9 mois. Des formes parasitaires qui persistent dans le foie pendant plus de deux ans (hypnozoïtes) sont à l'origine d'accès de reviviscence survenant à distance de l'infestation. La parasitémie dépasse rarement 2%.

- *Plasmodium ovale*

Très proche de *P. vivax*, il le remplace dans les zones où ce dernier est peu présent (Afrique noire). La période d'incubation varie de 15 jours à plusieurs mois et sa longévité est importante. Tout comme *P. vivax*, il peut donner lieu à des accès de reviviscence.

- *Plasmodium malariae*

La distribution géographique de *P. malariae* est clairsemée. L'incubation est longue (environ trois semaines) et des rechutes peuvent survenir à distance de l'infection (jusqu'à 20 ans) et seraient dues à des formes érythrocytaires latentes à la différence de *P. vivax* et *P. ovale*. Ce parasite infecte essentiellement les hématies âgées ce qui limite la parasitémie.

- *Plasmodium knowlesi*

P. knowlesi est un parasite du singe macaque rhésus. Il se transmet à l'homme vivant en bordure de forêts dans certaines régions d'Asie du Sud-Est (notamment en Malaisie et à Bornéo) où le moustique vecteur est capable de piquer autant le singe que l'homme. En dehors de ce pays, il est souvent confondu avec *P. vivax* et *P. falciparum*. Son incubation est brève et il ne semble pas donner de rechute à distance de l'infection. La parasitémie est modérée dans la plupart des cas mais il peut tout de même induire des cas sévères. L'importance croissante des infections à *P. knowlesi* en Asie, alors que l'incidence de *P. falciparum* et *P. vivax* diminue, amène à réfléchir quant à la conséquence de cette zoonose dans une stratégie d'éradication. En effet, la présence d'un réservoir animal pour ce parasite risque de compliquer les stratégies de lutte mises en place dans ces pays (Barber *et al.*, 2017; Gentilini, 2012).

2 . Cycle de développement de *Plasmodium*

Le parasite présente un cycle hétéroxène car il est hébergé par deux hôtes différents : un hôte définitif (chez qui se déroule la reproduction sexuée ou gamogonie) représenté par un moustique femelle du genre *Anopheles* et un hôte intermédiaire vertébré, chez qui se déroule la reproduction asexuée (schizogonie). Dans le deuxième cas, le parasite est intracellulaire strict et effectue deux cycles consécutifs de réplication asexuée. Le premier cycle se déroule dans le foie et est silencieux, le second prend place dans le sang et est responsable des manifestations cliniques de la maladie (**Figure 4**).

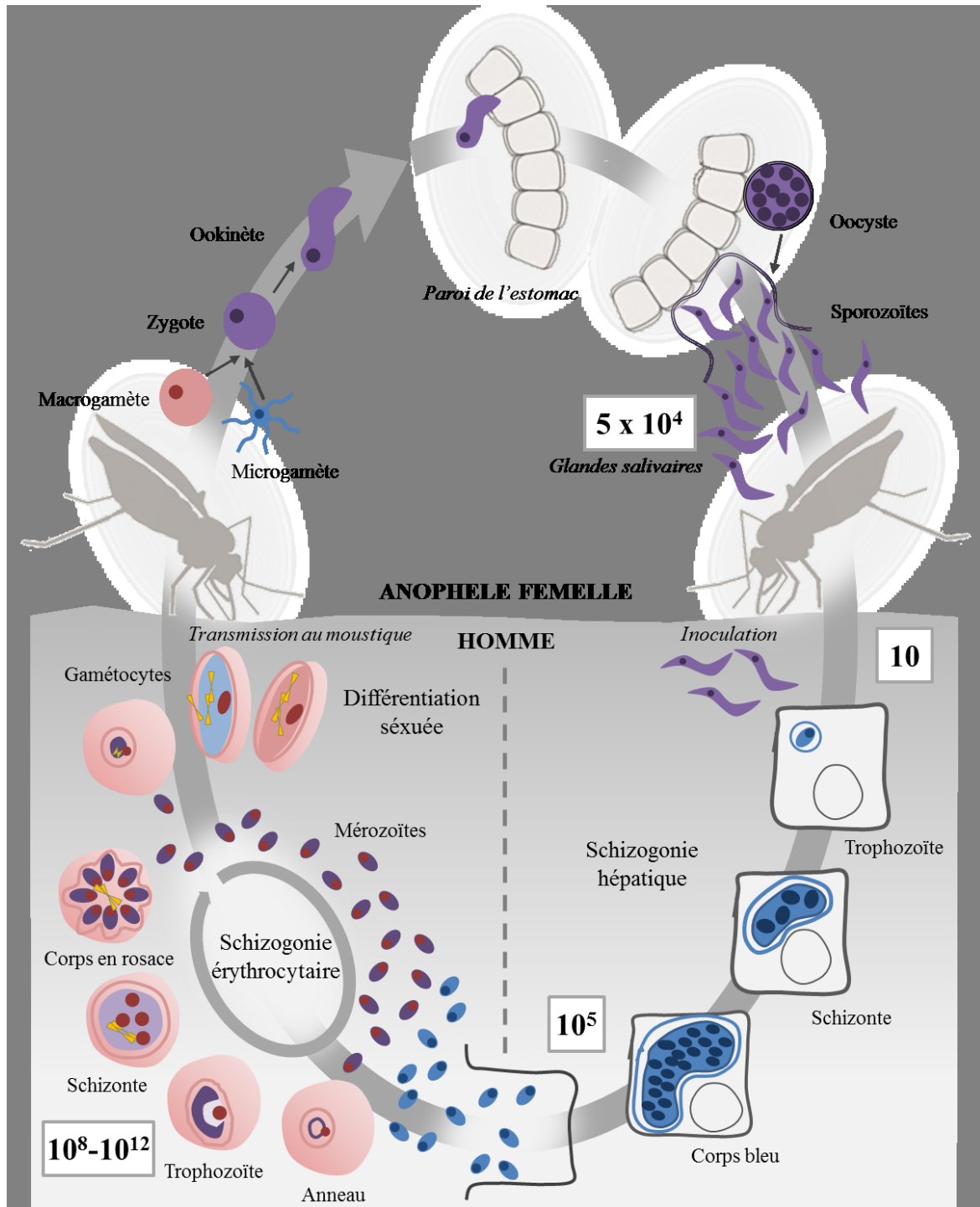


Figure 4. Cycle de développement de *P. falciparum* chez l'homme et le moustique anophèle. Le cycle débute par l'inoculation de sporozoïtes mobiles dans le derme qui vont ensuite rejoindre le foie. Chaque sporozoïte envahit un hépatocyte et s'y multiplie. Après environ une semaine passée dans le foie, les schizontes (ou corps bleus) éclatent, libérant ainsi dans la circulation sanguine des milliers de mérozoïtes qui vont envahir les hématies et entamer ainsi le cycle érythrocytaire. Les symptômes apparaissent quand le nombre total de parasites en circulation atteint environ 100 millions. Certains parasites vont se différencier en formes sexuées (gamétocytes) qui formeront des gamètes dans l'estomac du moustique après un nouveau repas sanguin. La fusion des gamètes va donner lieu à un ookinète mobile qui va traverser la paroi de l'estomac et se différencier en oocyste, sujet à une intense division. L'éclatement de l'oocyste va libérer des sporozoïtes qui vont migrer vers les glandes salivaires du moustique et attendre le prochain repas sanguin du moustique femelle. Le cycle complet dure environ un mois. Le nombre estimé de parasites impliqués à chaque étape du cycle est indiqué dans les rectangles blancs. Une charge parasitaire totale d'environ 10¹² parasites correspond approximativement à une parasitémie de 2% chez l'adulte. Copyright Flore Nardella, inspiré d'après le cycle ANOFEL (url : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/1.html>)

i. Schizogonie exo-érythrocytaire ou hépatique

Un faible *inoculum* de formes issues de la division sexuée, les sporozoïtes, sont injectés dans le derme par le moustique anophèle lors d'un repas sanguin (10 à 100 parasites). Les parasites se dispersent de façon active pendant environ 10 minutes et ralentissent lorsqu'ils atteignent un capillaire sanguin ou lymphatique, qu'ils vont entourer pendant un certain temps avant de le traverser pour rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique. Les adhésines de la famille TRAP (*sporozoite-specific thrombospondin-related anonymous protein*) semblent jouer un rôle important dans la motilité et donc la transmission du parasite car l'infection intradermique de souris par des parasites mutants exprimant une forme non clivable de TRAP induit une réduction du nombre de cellules hépatiques infectées d'un facteur supérieur à 1000 par rapport à la souche sauvage (Hegge *et al.*, 2010).

Une fois que les parasites ont atteint la circulation, ils vont migrer jusqu'au foie où ils traversent à nouveau l'endothélium avant de passer à travers une ou plusieurs cellules de Kupffer (macrophage propre au foie) puis d'infecter un hépatocyte. Le taux de sulfatation des protéoglycannes de surface semble conditionner la propension du parasite à migrer à travers une cellule ou à l'infecter. Les sporozoïtes migrent à travers les cellules qui expriment des *heparan-sulfate proteoglycans* (HSPGs) peu sulfatés, comme la peau et l'endothélium, tandis que les cellules exprimant des HSPGs très sulfatés vont activer les sporozoïtes et donc leur permettre de poursuivre leur invasion (Coppi *et al.*, 2007).

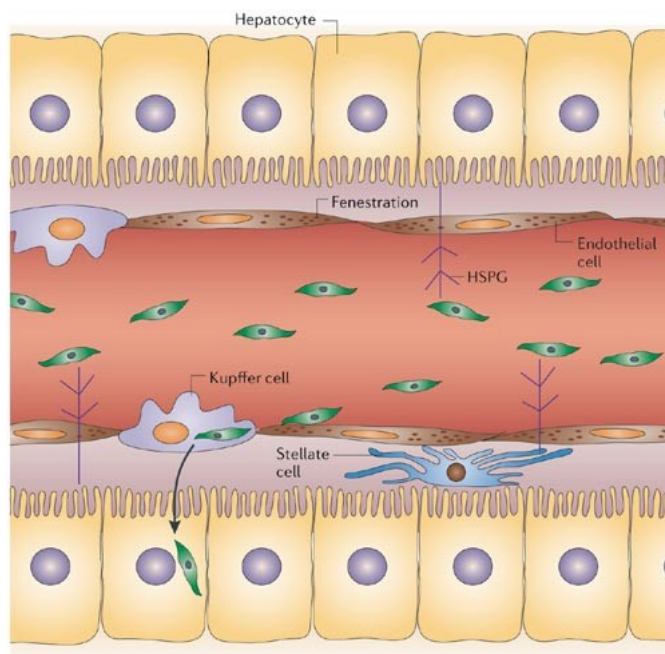


Figure 5. Représentation schématique de l'infection des cellules hépatiques par la forme sporozoïte de *Plasmodium*. HSPG = heparan-sulfate proteoglycan. D'après Prudêncio *et al.*, 2006

Par exemple, les cellules stellaires, présentes dans l'espace de Disse entre l'endothélium et les hépatocytes, expriment des protéoglycannes hautement sulfatés qui atteignent les cavités de l'endothélium veineux et peuvent ainsi interagir avec les sporozoïtes (**Figure 5**).

Moins d'une centaine de cellules cibles hépatiques sont infectées. Les sporozoïtes ayant réussi à infecter un hépatocyte vont se diviser de manière intense et former un schizonte qui peut contenir de 10 000 à 30 000 mérozoïtes. Cette phase dure entre 5,5 et 15 jours en fonction de l'espèce. La rupture de l'hépatocyte infecté induit la libération des mérozoïtes, qui vont rejoindre la circulation sanguine et y envahir les hématies. Chez les espèces *P. vivax* et *P. ovale*, le parasite peut rester quiescent au sein d'un hépatocyte. Cette forme appelée hypnozoïte peut induire des accès de reviviscence après des périodes d'incubation plus ou moins longues (quelques mois à plusieurs années en fonction de l'origine géographique), et donc une nouvelle crise palustre sans réinfection préalable. En région tropicale, les accès de reviviscence à *P. vivax* ont lieu en général toutes les 3 à 4 semaines alors qu'il peut rester latent pendant 8 à 10 mois en région tempérée. Le nombre de sporozoïtes inoculés semblerait conditionner le nombre et la fréquence des rechutes (White, 2011). Pour *P. malariae*, des accès palustres ont été mis en évidence jusqu'à 20 ans après le retour de zone d'endémie en l'absence de traitement, mais seraient probablement dus à un cycle érythrocytaire latent, la forme hypnozoïte n'ayant jamais été mise en évidence (Gentilini, 2012).

ii. Schizogonie érythrocytaire

Plasmodium étant un parasite à multiplication intracellulaire stricte chez l'hôte intermédiaire, l'entrée dans la cellule hôte est indispensable à sa survie. Les parasites se lient et entrent dans l'érythrocyte par différents mécanismes. Pour *P. falciparum*, ces interactions peuvent être différenciées en deux groupes en fonction de la dépendance de ce mécanisme à la présence d'acide sialique. La basigine, une glycoprotéine OK aussi appelée CD147, a été identifiée comme le récepteur permettant de lier la protéine parasitaire PfRh5 indépendamment de la souche considérée (Crosnier *et al.*, 2011). Pour *P. vivax*, le récepteur érythrocytaire prédominant est lié à l'antigène Duffy Fya ou Fyb. La majorité des personnes vivant en Afrique de l'ouest présentent un phénotype Duffy négatif FyFy et sont réfractaires à l'infection par *P. vivax* (White *et al.*, 2014a). Cependant, d'autres mécanismes minoritaires d'invasion sont vraisemblablement impliqués puisque l'infection sanguine asymptomatique à *P. vivax* est possible dans ces populations (Ménard *et al.*, 2010; Poirier *et al.*, 2016).

Les protéines parasitaires RBL et EBL impliquées dans l'adhésion semblent posséder des récepteurs spécifiques en fonction de l'espèce de *Plasmodium*. Ces protéines sont impliquées dans la propension à pouvoir infecter tous types d'hématies pour *P. falciparum*—et ainsi engendrer des parasitémies élevées, pouvant atteindre plus de 10%. Le parasite envahit plutôt les hématies âgées pour *P. malariae* et les hématies jeunes (réticulocytes) pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. knowlesi*, limitant ainsi la parasitémie à ce seul réservoir (valeurs normales de 0,2 à 2% des globules rouges). L'invasion pour

P. vivax serait notamment limitée aux réticulocytes très jeunes, qui présentent encore le marqueur de surface CD71 des progéniteurs érythrocytaires. Ces particularités font qu'il est très difficile de pouvoir cultiver ces parasites plus de quelques jours, la culture faisant appel à du sang de cordon ombilical et donnant lieu à des parasitemies très faibles. Pour *P. knowlesi*, qui infecte naturellement les macaques rhésus, mais qui prend de plus en plus de place en pathologie humaine, sa croissance est limitée en culture *in vitro* sur globules rouges humains. Cependant, une culture prolongée dans ces conditions permet au parasite de s'adapter. Cela induit une invasion plus importante des hématies plus âgées ce qui pourrait expliquer l'observation de parasitemies anormalement élevées chez l'homme. Enfin, la spécificité des protéines RBL et EBL pour leurs récepteurs érythrocytaire pourrait expliquer la préférence des différentes espèces de *Plasmodium* pour leur hôte. En effet, le séquençage du génome de *P. reichenowi*, parasite de chimpanzé, a montré que les régions de forte divergence avec le génome de *P. falciparum* concernaient les *loci* codant pour les protéines EBL et *PfRh*. Il se pourrait donc que la diversification de ces ligands impliqués dans l'invasion soit le principal élément menant à la préférence d'hôte de ces parasites très proches (Paul *et al.*, 2015).

Les Apicomplexes (phylum auquel appartient *Plasmodium*), contrairement aux bactéries ou virus qui infectent les cellules de manière passive, sont équipés de leur propre moteur d'actine et de myosine, qui non seulement permet leur mobilité (mécanisme appelé *gliding*) mais induit également une force mécanique qui leur permet de pénétrer la cellule hôte de façon active.

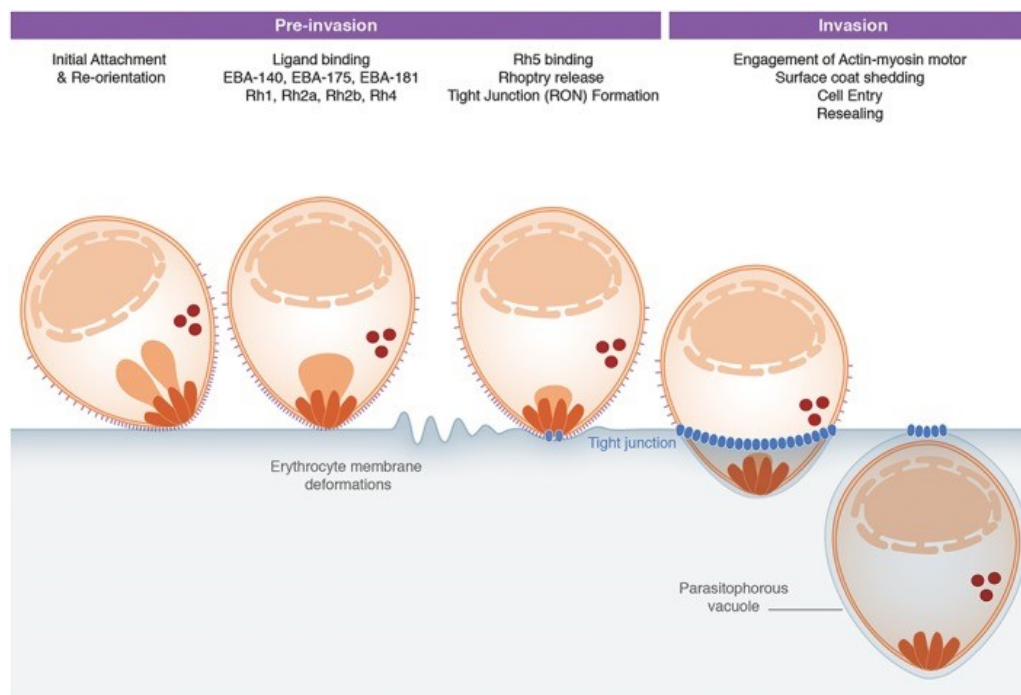


Figure 6. Processus actif de l'invasion du globule rouge par un mérozoïte de *Plasmodium*. Ce processus implique plusieurs phases successives : attachement initial, réorientation apicale, formation d'une jonction serrée (*zonula occludens*), encerclement actif du parasite et fermeture de la vacuole d'endocytose qui sera appelée vacuole parasitophore. D'après Koch and Baum, 2016

Le processus d'invasion est réalisé en 30 secondes à une minute (**Figure 6**). La phase de contact initiale implique la reconnaissance de récepteurs érythrocytaires par des protéines parasitaires appartenant à la famille MSP (*Merozoite Surface Protein*), dont la protéine MSP1 est la mieux caractérisée. En effet, le blocage de MSP1 — et d'autres protéines liant l'héparine — rend la majorité des mérozoïtes incapables de lier l'hématie (Boyle *et al.*, 2010). Cette liaison permet l'attachement initial du mérozoïte à l'hématie et est suivie par la réorientation apicale du parasite, médiée par la sécrétion de protéines de rhoptries et des micronèmes qui forment un gradient de concentration à la surface du mérozoïte. La concentration la plus forte est constatée au niveau apical et permet ainsi la réorientation du parasite sans besoin d'énergie. La formation d'une jonction serrée — notamment via l'interaction de la protéine AMA-1 avec son récepteur RON2 — suivi de l'encerclement actif du parasite médié par son moteur cellulaire formé d'actine et de myosine et de la fermeture de la vacuole parasitophore, finalisent l'étape d'invasion. Le parasite va ainsi pénétrer dans l'hématie par un mécanisme *endocytose-like* et évoluer au sein d'une vacuole parasitophore, qui correspond à la vacuole d'endocytose (Koch and Baum, 2016).

Pendant son développement, le parasite va remodeler l'érythrocyte de façon à permettre sa réplication. Il va exporter de nombreuses protéines à travers la vacuole parasitophore dans le cytoplasme et vers la membrane plasmique du globule rouge, qui vont lui permettre d'échapper au système immunitaire. En effet, *P. falciparum*, qui induit des formes sévères de paludisme, forme des structures membranaires (dites taches de Maurer en microscopie optique) dans le cytoplasme de la cellule hôte qui serviront au tri des protéines. Certaines des protéines exportées forment des protrusions sur la membrane plasmique, appelées *knobs*. Les *knob-associated histidin-rich protein* (KAHRP) sont un composant majeur des *knobs* qui interagissent avec le cytosquelette du globule rouge et permettent l'ancrage de la protéine *PfEMP1* (*erythrocyte membrane protein 1*). *PfEMP1* est un facteur de virulence majeur qui lie de nombreux récepteurs des capillaires. D'autres protéines non associées aux *knobs* comme RESA, MESA et *PfEMP3* modifient également les propriétés structurales du globule rouge en augmentant sa rigidité et son adhésion. Le parasite évite ainsi la filtration splénique et son élimination (Sakaguchi *et al.*, 2016).

En plus de remodeler l'érythrocyte, le parasite va subir de profonds changements morphologiques au cours de son cycle (**Figure 7**). Juste après l'invasion de l'hématie, le stade anneau a une forme amoeboïde et est complètement entouré du cytoplasme de la cellule hôte. Les structures subcellulaires noyau, mitochondrie et apicoplaste sont physiquement proches. Ce stade, où le parasite change peu de taille, va lui permettre de mettre en place les éléments nécessaires à sa croissance. Au stade trophozoïte, le parasite est plus grand et prend une forme ronde et la surface du globule rouge devient irrégulière. Le corps du parasite et le noyau augmentent en taille et une vacuole digestive se forme dans le cytoplasme suite à un mécanisme de pinocytose. La vacuole digestive — dont le pH est acide et où a lieu la digestion de l'hémoglobine — contient des cristaux d'hémozoïne proche de vésicules

globulaires contenant de l'hémoglobine. L'apicoplaste, présent entre le noyau et la vacuole digestive et proche de la mitochondrie, prend une forme aplatie. La mitochondrie quant à elle se ramifie. Des *knobs* et des taches de Maurer sont présents à la surface de l'érythrocyte.

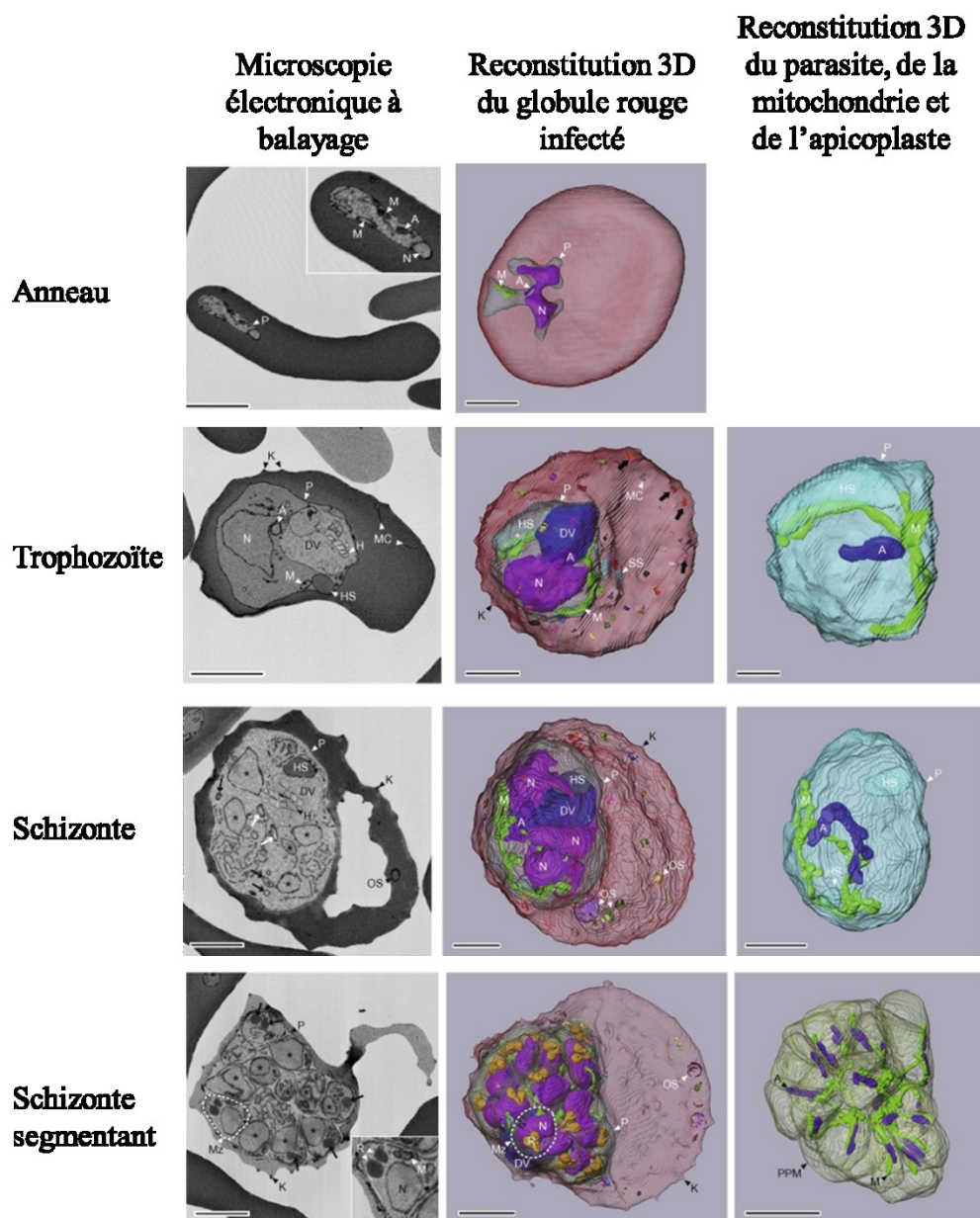


Figure 7. Reconstitution 3D de la morphologie de *P. falciparum* au cours du cycle érythrocytaire d'après des coupes séquentielles obtenues en microscopie électronique à balayage. P = parasite ; N = noyau ; M = mitochondrie ; A = apicoplaste ; DV = vacuole digestive ; H = hémozoïne ; HS = structure contenant de l'hémoglobine ; MC = taches de Maurer ; SS = structure *slit-like* ; K = *knob* ; OS = structure membranaire ovale ; Mz = mérozoïte ; R = rhoptrie. Les barres d'échelle correspondent à 2 μ m. Images combinées d'après Sakaguchi *et al.*, 2016

Quand le parasite commence à se diviser et que plusieurs noyaux sont visibles, il est appelé schizonte. A ce stade, le parasite a encore augmenté de volume et le volume du cytoplasme de la cellule hôte est réduit, dû au prélèvement de son contenu par le parasite. Le noyau se réplique et l'apicoplaste, tout comme la mitochondrie précédemment, se ramifie. La vacuole digestive contenant les cristaux

d'hémozoïne est toujours accolée à des structures contenant de l'hémoglobine. Les *knobs* et les taches de Maurer sont toujours présents, même s'ils semblent moins nombreux. A leur place, de nombreuses structures membranaires en anneau sont présentes dans le cytoplasme globulaire et pourraient correspondre à des protrusions de la vacuole parasitophore appelées *tubovesicular network* (TVN). Ces structures n'interagissent pas avec la membrane de l'érythrocyte.

Au stade schizonte âgé (segmentant, aussi appelé corps en rosace), le parasite contient 6 à 30 cellules filles (mérozoïtes) contenant chacune des rophies au niveau apical. Le parasite occupe la majeure partie du volume du globule rouge et les *knobs* sont toujours présents sous sa membrane. La division de l'apicoplaste semble se terminer avant celle de la mitochondrie qui est toujours ramifiée, chaque branche de la mitochondrie étant attachée à un seul apicoplaste. La vacuole digestive est entourée par les mérozoïtes. Les taches de Maurer sont moins visibles, celles-ci disparaissant avant l'éclatement du globule rouge (Sakaguchi *et al.*, 2016).

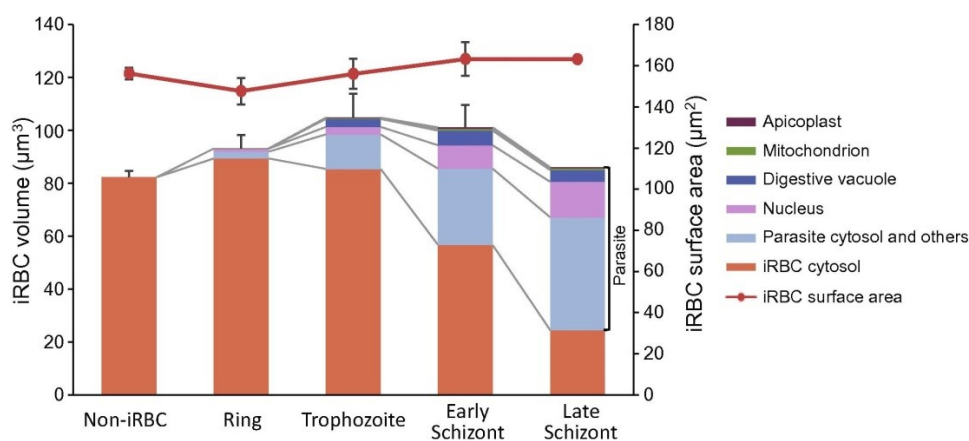


Figure 8. Evolution du volume du parasite (histogramme, axe de gauche) et de la surface du globule rouge (courbe, axe de droite) au cours du cycle érythrocytaire. D'après Sakaguchi *et al.*, 2016

Le volume du globule rouge va augmenter au stade trophozoïte puis diminuer au stade schizonte (Figure 8). Il y a de nombreux échanges entre le globule rouge infecté et le milieu extracellulaire pendant la croissance du parasite. Aux stades précoces, la plupart des nutriments proviennent du milieu extracellulaire et aux stades tardifs, quand le parasite se divise, les déchets métaboliques accumulés sont éliminés. Le parasite apicomplexe *Babesia* forme une structure tubulaire au contact direct du milieu extra-cellulaire pour se nourrir et exporter ses déchets (Guimarães *et al.*, 2003), ce qui n'est pas le cas pour *Plasmodium*. Ce dernier va augmenter la perméabilité membranaire du globule rouge à de nombreux solutés en exportant des protéines à sa membrane, appelés *new permeation pathways* (NPP). L'inversion de la concentration intracellulaire de sodium et de potassium médiée par ces protéines pourrait être responsable de l'augmentation du volume du globule rouge au stade trophozoïte. La forte consommation d'hémoglobine—jusqu'à 80% du contenu de l'hématie—par le parasite excède ses besoins en acides aminés. Il semblerait que l'absorption et la dégradation de l'hémoglobine permette au parasite de maintenir l'intégrité du globule rouge alors qu'il occupe un

espace de plus en plus important au fur et à mesure de sa croissance (Mauritz *et al.*, 2009; Sakaguchi *et al.*, 2016).

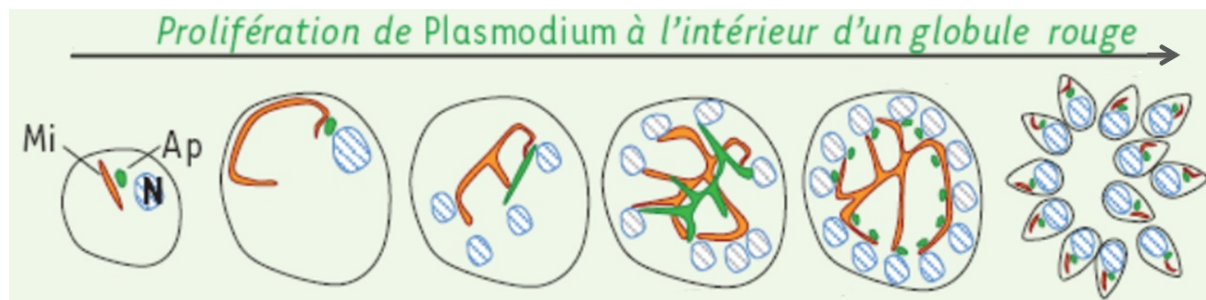


Figure 9. Division de *Plasmodium* au sein de l'érythrocyte, d'après Biot *et al.*, 2012. Mi = mitochondrie, Ap = apicoplaste, N = noyau.

Plasmodium se multiplie selon un processus appelé schizogonie. Le stade anneau progresse au stade trophozoïte où il passe d'un stade 1 n à 2 n chromosomes puis répète trois fois un cycle comprenant la synthèse d'ADN, une phase de mitose et de division nucléaire pour donner un schizonte syncytial avec 6 à 30 noyaux (1 n). De manière synchrone, la rupture du schizonte libérera les mérozoïtes 1 n dans la circulation qui iront envahir de nouvelles hématies (Gerald *et al.*, 2011) (Figure 9).

Un cycle de division asexuée dure approximativement 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* et 72 heures pour *P. malariae*. Pour *P. knowlesi*, le cycle ne dure que 24 heures. L'éclatement du globule rouge et la libération des mérozoïtes sont contemporains des accès de fièvre qui sont appelées tierces pour les 3 premières espèces et quartes pour *P. malariae*. Chez un individu sain infecté par *P. falciparum*, le nombre de parasite augmente entre 6 et 20 fois par cycle. C'est six à huit jours après la phase hépatique, quand la densité parasitaire atteint environ 50 parasites par microlitre de sang (environ 10^8 parasites au total), que la phase symptomatique débute. La phase d'incubation est donc d'environ 12 à 14 jours après la piqûre infectante.

iii . Gamogonie

Certains parasites érythrocytaires vont se différencier en formes sexuées à durée de vie prolongée : les gamétocytes mâle et femelle, seules formes capables d'infecter le moustique. Chez *P. falciparum*, contrairement aux autres espèces parasitant l'homme, la gamogonie est retardée, un pic étant observé entre 7 et 10 jours après l'initiation de la phase sanguine. Chez *P. falciparum*, la gamogonie inclut cinq stades (I-V) présentant des morphologies différentes, le stade transmis au moustique présentant une morphologie « en banane » ou « en faucille » qui lui a donné son nom. Toutes les étapes de multiplication chez l'homme se font par mitoses, la méiose (et donc la recombinaison génétique) ayant lieu chez le moustique (hôte définitif).

iv . Sporogonie

Au sein de l'estomac du moustique, le gamétoocyte mâle (aussi appelé microgamétoocyte) va subir trois cycles rapide de synthèse d'ADN et de mitoses ou le parasite 1 n va devenir 8 n en une dizaine de minutes. En moins de trois minutes, ce matériel génétique va se séparer pour donner 8 gamètes mâles 1 n flagellés, ce phénomène est appelé exflagellation. Un faible nombre de microgamètes mâles vont fusionner avec un macrogamète femelle et créer un zygote diploïde (2 n). Ces zygotes vont se différencier en ookinètes mobiles (4 n), qui iront s'enkyster sous forme d'oocystes du côté basal de la lamina, de l'autre côté de la paroi de l'estomac. Pendant plusieurs jours, chaque oocyste va subir 10 à 11 cycles de réplication pour former une cellule syncytiale appelée sporoblaste (ou oocyste) contenant des milliers de noyaux. Une cytocynèse massive permet alors d'aboutir à des milliers de cellules filles haploïdes (1 n) mobiles appelées sporozoïtes. L'éclatement du sporoblaste induit la libération des sporozoïtes qui migrent alors vers les glandes salivaires du moustique et pourront être inoculés au prochain repas sanguin (Gerald *et al.*, 2011). Au total, le cycle complet dure environ un mois.

3 . Physiopathologie

Les symptômes du paludisme sont liés à la schizogonie érythrocytaire, la schizogonie hépatique étant asymptomatique. L'hôte réagit à l'infection en augmentant la filtration splénique, accélérant ainsi l'élimination des hématies parasitées et de certaines hématies saines (en cas de fortes parasitémies). La rupture des schizontes libère des débris cellulaires de l'hôte et du parasite, notamment l'hémozoïne qui est pyrétogène, ce qui active les macrophages et va induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α en grande partie), provoquant des fièvres et d'autres effets pathologiques. En zone endémique, le paludisme est la cause la plus fréquente de fièvre. Les premiers symptômes sont en général non spécifiques : malaise, céphalées, asthénie, myalgies, douleurs abdominales et fièvres discontinues. Sont souvent présents également nausées, vomissement et hypotension orthostatique. La gravité des symptômes dépend de l'espèce plasmodiale, de la densité parasitaire et du degré de prémunition de l'hôte. Des convulsions généralisées sont associées au paludisme à *P. falciparum* et peuvent être suivies d'un coma (paludisme cérébral ou accès pernicieux). *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, qui parasitent les hématies de façon sélective, ne présentent habituellement pas de parasitémies supérieures à 2%.

i . Paludisme non compliqué à *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*

La plupart des patients présentant un accès palustre simple présentent peu de symptômes en dehors d'une forte fièvre (pouvant atteindre 39 à 40 °C), une anémie légère et après quelques jours une hépatosplénomégalie. Si l'éclatement des schizontes est asynchrone, la fièvre est irrégulière ou apparemment continue, s'il est synchrone, la fièvre est intermittente, quotidienne, tierce ou quarte selon la périodicité de la schizogonie (24, 48 ou 72 heures, **Figure 10**). Quand elle est synchrone (ou périodique) la fièvre se caractérise par trois stades stéréotypés : un stade de frissons (sensation de froid

avec tremblements), un stade de chaleur où la température corporelle atteint 40 °C ou plus, un stade de sueurs profuses accompagnant la défervescence thermique.

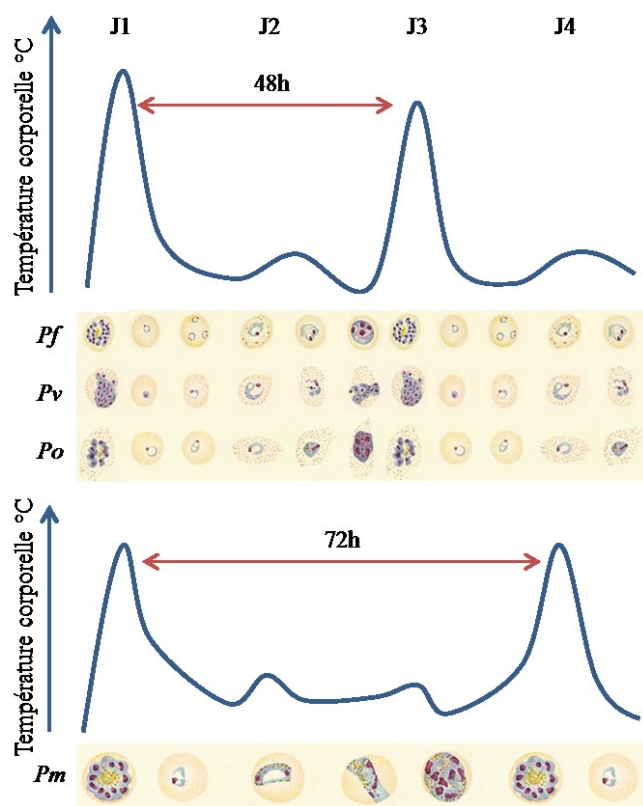


Figure 10. Fréquence des fièvres (tierces ou quartes) induites par les différentes espèces de *Plasmodium*. Les accès fébriles sont contemporains de l'éclatement des schizontes et de la libération des mérozoïtes. Pf = *P. falciparum*, Pv = *P. vivax*, Po = *P. ovale*, Pm = *P. malariae*.

Le terrain du patient — sujet âgé ou présentant une hémoglobinopathie — ou l'automédication ou un traitement mal conduit peuvent modifier ce tableau clinique. L'anémie est essentiellement due à la lyse des globules rouges parasités (érythrophagocytose). Lors d'une infection à *P. falciparum*, qui induit une rigidification de l'hématie à partir du stade trophozoïte et qui sécrète des antigènes RESA se liant aux hématies non parasitées, les hématies saines peuvent également être détruites. La splénomégalie et l'hépatomégalie sont dues à l'hyperactivité de ces organes. La rate, dont un des rôles physiologique est de débarrasser le sang de ses hématies âgées ou déformées, va filtrer une partie des globules rouges parasités (phagocytose par les monocytes-macrophages résidents) ou expulser le parasite avec remise en circulation de l'hématie (*pitting*). Le foie intervient par l'activité phagocytaire des cellules de Küpffer et par la transformation de l'hémoglobine libérée en bilirubine libre, donnant lieu à un subictère. L'hépatomégalie est plus fréquente chez l'enfant, tandis que le subictère est plus fréquent chez l'adulte. Dans les régions de transmission stable, des infections récurrentes induisent une anémie et une splénomégalie chroniques (Eholié *et al.*, 2008; Gentilini, 2012; White *et al.*, 2014a).

La prise en charge rapide et adéquate du paludisme non compliqué induit une mortalité inférieure à 0,1%. En l'absence de traitement, avec *P. falciparum* le plus souvent, mais aussi avec *P. knowlesi* et *P. vivax*, l'accès palustre peut rapidement évoluer vers un accès grave.

ii . Paludisme compliqué à *P. falciparum*

Les accès graves surviennent préférentiellement chez des sujets non immuns, enfant ou adultes, et représentent 6 à 10 % des accès à *P. falciparum*.

a . Physiopathologie

Le paludisme compliqué à *P. falciparum* doit ses particularités à la multiplication rapide du parasite et à la cytoadhérence des hématies parasitées par les formes matures aux cellules endothéliales des capillaires viscéraux. De plus les hématies infectées étant plus sphériques et rigides et formant des rosettes avec des hématies saines, en plus de la perte de déformabilité des hématies saines en cas de fortes parasitémies, conduisent à une circulation ralentie au niveau des microvaisseaux, ce qui entraîne une anoxie des tissus en aval de ces vaisseaux. Les protubérances (*knobs*) présentes à la surface de l'hématie exportent des protéines médiant la cytoadhérence (dont *PfEMP1*) à la membrane de l'érythrocyte, qui vont se lier à des récepteurs des cellules endothéliales. ICAM1 semble être le récepteur le plus important au niveau cérébral, la chondroïtine-sulfate A (CSA) au niveau du placenta et CD36 dans la plupart des autres organes. La visualisation directe de la microcirculation de la rétine, buccale ou rectale révèle des micro-obstructions réversibles et hétérogènes. L'étendue de l'obstruction est liée à la sévérité clinique et à des paramètres pronostics bien définis comme la lactatémie et l'acidémie. La libération locale d'hémoglobine et d'hème consomme le monoxyde d'azote (NO) et induit une dysfonction endothéliale. Les concentrations en L-arginine — précurseur de NO — sont faibles et celles de diméthylarginine asymétrique (ADMA, un inhibiteur de la NO-synthase) sont augmentées chez les patients atteints de paludisme sévère. L'activation endothéliale provoque l'exocytose des corps de Weibel-Palade qui contiennent des molécules biactives comme le facteur de Willebrand et l'angiopoïétine 2. Les plaquettes activées exprimant le récepteur CD36 (récepteur de *PfEMP1*) vont lier des polymères de facteur de Willebrand et ainsi augmenter la cytoadhérence. Les concentrations de ADAMTS13, qui clive et inactive ces polymères, sont faibles chez les patients atteints de paludisme sévère. De plus, la libération *in situ* de substances vasoactives (sérotonine, histamine, ...) aggrave les troubles de la microcirculation en créant une vasodilatation des capillaires et des infiltrats hémorragiques périvasculaires.

Le tableau clinique du paludisme sévère à *P. falciparum* dépend de l'âge du patient (**Figure 11**). Une anémie sévère et une hypoglycémie sont plus fréquentes chez l'enfant alors qu'un œdème pulmonaire aigu, une insuffisance rénale et/ou un ictère sont plus fréquents chez l'adulte. Le coma (accès pernicieux ou paludisme cérébral) et l'acidose sont aussi fréquents dans les deux groupes. La mortalité

augmente quand la parasitémie dépasse 2 %, bien que la relation entre la densité parasitaire et le pronostic soit très variable.

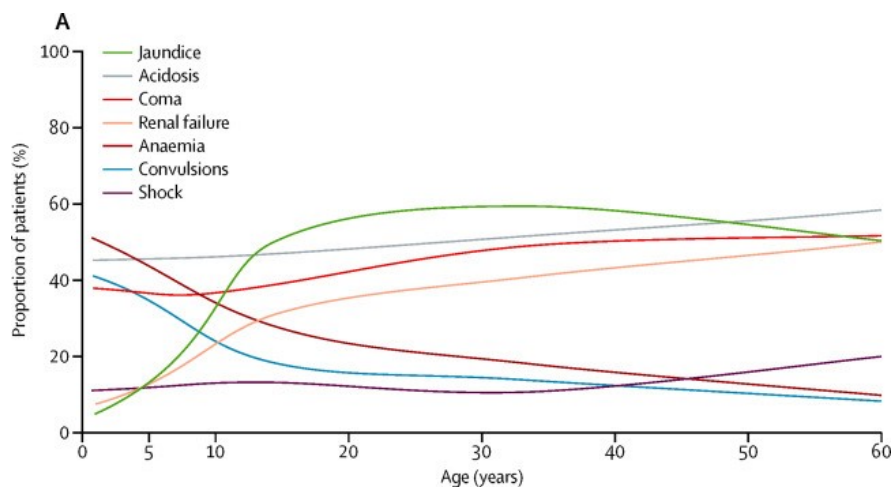


Figure 11. Symptômes du paludisme sévère en fonction de l'âge. D'après White *et al.*, 2014a

b. Symptomatologie

Le diagnostic de paludisme grave repose sur la présence d'un ou plusieurs signes cliniques ou biologiques de gravité (**Tableau 1**), associés à une parasitémie à *P. falciparum*. Les manifestations qui définissent le paludisme grave sont rarement isolées et peuvent être diversement associées. Elles comprennent le plus souvent une prostration, un ictère et une insuffisance rénale. Le pronostic vital est d'avantage fonction des défaillances respiratoire, circulatoire et métabolique. Le neuropaludisme est caractérisé par une encéphalopathie aigüe fréquemment associée à une fièvre, un coma et une abolition des réflexes cutanés. Il peut également être accompagné de convulsions, d'une abolition des réflexes ostéo-tendineux et de signes méningés ainsi que de manifestations psychiatriques (agitation psychomotrice, confusion mentale). Le paludisme grave est souvent associé à une thrombocytopénie (plaquettes < 20.000/mm³) et, de façon plus rare, à des manifestations hémorragiques.

Tableau 1. Critères de gravité du paludisme à *P. falciparum* définis par l'OMS. D'après OMS, 2000

Critères de gravité du paludisme à <i>P. falciparum</i> (OMS, 2000)		
Valeur pronostique (VP) et fréquence relative (FR) chez l'adulte		
Critères de l'OMS	VP	FR
Manifestations cliniques		
Prostration, extrême faiblesse	?	+++
Détresse respiratoire (dyspnée d'acidose)	+++	+
Troubles de la conscience (score de Glasgow modifié < 10)	+	++
Convulsions répétées	++	+
Etat de choc (pression artérielle systolique < 80 mmHg et signes périphériques d'insuffisance respiratoire)	+++	+
Œdème pulmonaire		

Critères de gravité du paludisme à *P. falciparum* (OMS, 2000)

Valeur pronostique (VP) et fréquence relative (FR) chez l'adulte

Critères de l'OMS	VP	FR
Saignement anormal	+++	+
Ictère (définition clinique ou bilirubine totale > 50 µmol/l)	++	+
Hémoglobinurie macroscopique	+	+++
Manifestations biologiques	+	+
Anémie sévère (hémoglobine < 5 g/dl ou hématoците < 15%)		
Hypoglycémie (glycémie < 0,4 g/l)	+	+
Acidose (pH artériel < 7,35 ou bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/l)	+++	++
Hyperlactatémie (lactates plasmatiques > 5 mmol/l)	+++	++
Hyperparasitémie (≥ 4 % chez le sujet non immun ou ≥ 20 % chez le sujet semi-immun)	+++	++
	++	+
Insuffisance rénale (créatininémie > 30 mg/l + diurèse < 400 ml/j)		
	++	+++

L'acidose résulte de l'accumulation d'acides organiques comme le l'acide lactique, dont la présence est due à la glycolyse anaérobie résultant d'une hypoxie locale, la production de lactate par le parasite et la diminution de la clairance hépatique et rénale du lactate. Une hyperventilation en réponse à l'acidose (dyspnée acidotique) est un facteur de mauvais pronostic et est souvent suivi d'une insuffisance circulatoire réfractaire à l'expansion volumique et aux médicaments inotropes positifs (augmentant la force de contraction du muscle cardiaque) voire d'un arrêt respiratoire.

L'hypoglycémie est associée à l'acidose lactique et est particulièrement problématique chez l'enfant et la femme enceinte. Elle est due à une défaillance de la néoglucogénèse hépatique et à une augmentation de la consommation de glucose. De plus, l'hypoglycémie hyperinsulinique est un effet secondaire important de la quinine, un puissant stimulant de la sécrétion pancréatique d'insuline. Cet effet est particulièrement fréquent chez la femme enceinte même dans le cas d'un accès palustre simple.

Le syndrome de détresse respiratoire aigu est une complication redoutée chez l'adulte et particulièrement chez la femme enceinte et peut également être présent suite à une infection par *P. vivax* ou *P. knowlesi*. Une perméabilité augmentée des capillaires pulmonaires est présente chez 30 % des patients et se manifeste souvent après le début du traitement. Sa prise en charge doit être faite avec prudence, une perfusion trop rapide pouvant être létale. En l'absence de ventilation mécanique, le décès dépasse encore 50 % des cas pour *P. falciparum*. Pour *P. vivax*, le pronostic est meilleur.

L'insuffisance rénale aiguë est fréquente chez l'adulte atteint de paludisme sévère. Elle est fréquemment associée à une défaillance multiviscérale induisant une forte mortalité mais peut également se développer plus lentement alors que les autres symptômes s'améliorent. Une oligurie est constatée dans 60 à 70 % des cas et se résout en environ quatre jours chez les survivants. La créatininémie revient à la normale en environ 17 jours. La mise en place précoce d'une dialyse permet d'améliorer le pronostic vital.

Un ictère sévère résulte de la combinaison d'une hémolyse sévère, d'une dysfonction hépatique et d'une choléstase. Ce symptôme est plus fréquent chez l'enfant que chez l'adulte et est souvent accompagné d'une insuffisance rénale. L'infection par le virus de l'hépatite B prédispose au paludisme sévère chez l'adulte (Eholié *et al.*, 2008; Gentilini, 2012; White *et al.*, 2014a).

iii . Paludisme compliqué à *P. vivax*

Depuis 5 ans, de plus en plus de cas de paludisme sévère voire fatal à *P. vivax* ont été rapportés en Indonésie, Papouasie Nouvelle-Guinée, Inde et dans la région de l'Amazonie. Ces études contrastent avec les observations historiques concluant à une faible proportion de cas sévères de paludisme dû à *P. vivax*. Il est cependant difficile de savoir si ces cas sont le résultat de l'émergence de souches de virulence augmentée, d'une sévérité précédemment sous-estimée ou d'une sur-déclaration de cas pouvant présenter des comorbidités associées (White *et al.*, 2014a).

iv . Paludisme et grossesse

Dans les zones de fortes transmissions, le risque de faible poids de naissance (< 2,5 kg) double quand les femmes sont atteintes de paludisme gestationnel, l'effet étant plus important chez la femme nulli- ou paucipare. Un faible poids à la naissance est associé avec une mortalité infantile accrue. L'anémie de la mère est exacerbée mais beaucoup de femmes sont asymptomatiques malgré une accumulation intense d'hématies infectées dans la microcirculation placentaire. Le paludisme congénital a lieu chez environ 5 % des nouveaux nés mais est spontanément résolutif dans 62 % des cas. L'infection par le VIH prédispose les femmes enceintes au paludisme et diminue encore le poids de naissance. Dans les zones de faible transmission, les femmes enceintes ont un risque accru de développer un paludisme sévère accompagné d'un fort taux de mortalité d'environ 50%. De fortes parasitémies, une anémie sévère, une hypoglycémie et un œdème pulmonaire aigu sont les symptômes plus fréquents chez la femme enceinte. En cas de paludisme sévère, une détresse fœtale, un accouchement prématuré et une mortinatalité sont souvent rencontrés (White *et al.*, 2014a).

Lors d'une infection à *P. vivax* pendant la grossesse, l'évolution vers une forme sévère est très rare. La séquestration placentaire du parasite est faible et la diminution du poids de naissance est moins importante que pour *P. falciparum* (107 g en moyenne contre 170 g pour *P. falciparum*) (White *et al.*, 2014a).

Des infections à *P. falciparum* ou *P. vivax*, même si elles sont paucisymptomatiques et correctement prises en charge, augmentent le risque d'avortement et de petit poids de naissance. La mortalité infantile est particulièrement élevée en cas d'infection en fin de grossesse. De plus, la mortalité maternelle par hémorragie lors de l'accouchement est corrélée à l'importance de l'anémie (White *et al.*, 2014a).

4 . Prise en charge du paludisme

i . Non compliqué à *P. falciparum* (OMS, 2015)

L'objectif clinique du traitement d'un accès simple à *P. falciparum* est de réduire la charge parasitaire le plus rapidement possible pour éviter l'évolution vers une forme grave. La guérison est définie comme l'élimination de tous les parasites présents dans le corps. Les objectifs de santé publique sont également de prévenir la transmission du parasite et de ralentir l'émergence de résistances.

Pour cela, le traitement de l'accès simple à *P. falciparum* fait appel à une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (CTA). Cette combinaison comprend un dérivé de l'artémisinine qui va agir de façon rapide associé à un médicament partenaire, dont l'élimination est plus lente, qui va agir de façon prolongée. Le dérivé de l'artémisinine permet d'éliminer rapidement les parasites sanguins — permettant de réduire la charge parasitaire d'un facteur 10^4 toutes les 48 heures — et est également actif vis-à-vis des gamétocytes jeunes (stades I-III) ce qui limite la transmission au moustique. Le médicament partenaire permet d'éliminer les parasites restants et ralentit le développement de résistances aux dérivés de l'artémisinine. Les médicaments partenaires présentant une demi-vie d'élimination longue (comme la méfloquine) permettent également une prophylaxie post-traitement.

Cinq CTA sont actuellement recommandées par l'OMS pour le traitement de l'adulte (hors femme enceinte au premier trimestre) et de l'enfant :

- Artéméther (4 mg/kg/j) – luméfántrine (5 à 24 mg/kg/prise), en deux doses quotidiennes, de préférence avec un aliment gras
- Artésunate (4 mg/kg/j) – amodiaquine (10 mg/kg/j)
- Artésunate (4 mg/kg/j) – méfloquine (8,3 mg/kg/j)
- Artésunate (4 mg/kg/j pendant 3 jours) – sulfadoxine-pyriméthamine (une dose unique à J1 d'au moins 25/1,25 mg/kg)
- Dihydroartémisinine (4 mg/kg/j) – pipéraquline (18 mg/kg/j), doses adaptées chez l'enfant de moins de 25 kg : dihydroartémisinine (4 mg/kg/j) – pipéraquline (24 mg/kg/j)

Les posologies des deux médicaments sont adaptées en fonction du poids du patient. Le choix de la combinaison se fait en fonction de la présence de résistances au médicament partenaire dans chaque pays. Un traitement de trois jours permet de couvrir deux cycles de 48 heures, ce qui assure que seule une petite fraction des parasites sera soumise à l'élimination par le médicament partenaire seul, ce qui

réduit le risque d'apparition de résistances. Des traitements plus courts d'un à deux jours ne sont pas recommandés car ils sont moins efficaces, ont moins d'effet sur les gamétocytes et offrent moins de protection pour le médicament partenaire vis-à-vis du risque d'émergence de résistances.

Afin de réduire la transmission, la primaquine à faible dose (0,25 mg/kg en dose unique) pourra être associée dans les zones de faible transmission (excepté chez la femme enceinte ou l'enfant de moins de 6 mois). L'évaluation du déficit en G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase) n'est pas requise dans le cas d'une faible dose.

Le traitement symptomatique fera appel à un antipyrétique (paracétamol) et éventuellement à un antiémétique — qui devra être pris avec précaution étant donné qu'un effet sédatif et que des effets secondaires neuropsychiatriques peuvent mimer un paludisme sévère. En présence de vomissements répétés, le patient doit être traité par voie parentérale.

Populations particulières :

- Femme enceinte au premier trimestre. Le traitement fait appel à l'association quinine + clindamycine pendant 7 jours.
- Enfants de moins de 5 kg. Ils seront traités avec la même dose de CTA qu'un enfant de 5 kg.
- Patients infectés par le VIH. Si le patient est traité par cotrimoxazole, éviter l'association artésunate sulfadoxine-pyriméthamine (risque augmenté d'anémie, de thrombopénie, de leucopénie ou d'agranulocytose) ; si le patient est traité par efavirenz ou zidovudine, éviter l'association artésunate-amodiaquine (risque d'hépatite médicamenteuse augmenté).

ii . Non compliqué à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* (OMS, 2015)

Le traitement du paludisme non compliqué à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ou *P. knowlesi* fait appel soit à l'utilisation d'une CTA, soit à la chloroquine. La chloroquine sera utilisée dans les zones où les résistances à ce traitement ne sont pas décrites (sous-continent indien en particulier).

Prévention des rechutes à *P. vivax* ou *P. ovale* :

Le statut G6PD du patient doit guider le traitement mis en place. Traiter l'adulte ou l'enfant par 0,25 à 0,5 mg/kg/j de primaquine pendant 1 à 4 jours (sauf la femme enceinte ou allaitante, les enfants de moins de 6 mois et les personnes G6PD-déficientes). Chez les déficients en G6PD, la primaquine-base doit être utilisée à une dose de 0,75 mg/kg, une fois par semaine pendant 8 semaines, sous surveillance médicale étroite. Quand le statut G6PD n'est pas connu et que le diagnostic n'est pas disponible, la prescription de primaquine doit être faite en tenant compte du rapport bénéfice/risque pour le patient. Chez la femme enceinte ou allaitante, une chimioprophylaxie hebdomadaire à la chloroquine doit être mise en place jusqu'à l'accouchement ou la fin de l'allaitement, le traitement à la primaquine ayant lieu par après, en fonction du statut G6PD.

iii . Compliqué à *P. falciparum* (OMS, 2013)

Le paludisme grave est une urgence thérapeutique, le tableau clinique du malade pouvant rapidement se dégrader et mener au décès de l'individu.

Les formes graves de paludisme chez l'enfant et l'adulte sont traitées par Artésunate 2,4 mg/kg par voie intraveineuse (i.v.) de préférence ou intramusculaire (i.m.) à l'admission (t = 0) puis 12 et 24 heures plus tard. Par la suite le traitement se fera une fois par jour jusqu'à ce que le patient soit capable de prendre ses médicaments par voie orale.

Si l'artésunate injectable n'est pas disponible, le traitement peut se faire par artéméther i.m. (3,2 mg/kg à l'admission puis 1,6 mg/kg/j) ou sel de quinine (20 mg/kg en dose de charge puis 10 mg/kg toutes les 8 heures). La quinine est préférentiellement administrée en perfusion intraveineuse lente (2 à 4 heures, la vitesse de perfusion ne dépassant pas 5 mg/kg/h), diluée dans 10 mg/kg de soluté salin isotonique. Si la voie veineuse n'est pas possible, la quinine peut être administrée par voie i.m. à la même posologie, sur la face antérieure de la cuisse en deux sites distincts.

Chez la femme enceinte, où le taux de mortalité par paludisme grave atteint 50 %, les antipaludiques par voie parentérale sont administrés sans tarder, et ce quel que soit le stade de la grossesse et sans réduire la dose. L'artésunate constitue le traitement de choix. En cas d'indisponibilité, l'artéméther sera préféré à la quinine en fin de grossesse car elle est associée à un risque d'hypoglycémie de 50 %.

Traitement relais *per os* : le traitement est complété par une cure complète d'une CTA (efficace dans la zone où l'infection a été contractée) dès que le patient est capable de prendre ses médicaments *per os*, mais après au moins 24 heures de traitement par voie parentérale. Les CTA recommandées par l'OMS dans ce cas sont les mêmes que celles du paludisme non compliqué. L'association artésunate-méfloquine devra être évitée en cas de guérison d'un neuropaludisme en raison du risque de réactions neuro-psychiatriques.

Il conviendra de surveiller et traiter les symptômes associés notamment de :

- Contrôler rapidement la glycémie et corriger une éventuelle hypoglycémie
- Traiter les convulsions avec une benzodiazépine (diazépam, midazolam ou lorazépam en injection i.v.). Une deuxième dose peut-être administrée si la crise convulsive persiste plus de 10 min. En cas d'état de mal épileptique (persistance des convulsions) malgré l'administration de deux doses le patient peut être traité par phénytoïne (18 mg/kg, i.v.) ou phénobarbital (15 mg/kg i.v. ou i.m.). Dans ce dernier cas, la respiration devra être étroitement surveillée, le phénobarbital à forte dose (20 mg/kg) ayant été associé à un risque accru de décès.
- Rétablir l'équilibre hydrique du patient

- Surveiller la diurèse et l'apparition d'urines brunes ou noires (hémoglobinurie) ou d'une oligurie pouvant évoquer une atteinte rénale aiguë
- Surveiller régulièrement la température centrale, le rythme et la profondeur de la respiration, le pouls, la tension artérielle et l'état de conscience permettant de mettre en évidence une hypoglycémie, une acidose métabolique (hyperventilation compensatoire), l'œdème pulmonaire ou un choc par hypotension
- Faire baisser une température corporelle élevée (> 39 °C) en traitant par paracétamol, éviter les médicaments augmentant le risque de saignements intestinaux (aspirine, corticoïdes)
- Surveiller la réponse thérapeutique sur le plan clinique et parasitologique au moyen d'examen réguliers.

iv . Paludisme grave à *P. vivax* et *P. knowlesi* (OMS, 2015)

La prise en charge du paludisme sévère à *P. vivax* et *P. knowlesi* se fait de la même façon que pour *P. falciparum*, le relai *per os* pouvant être fait par chloroquine dans les zones de sensibilité conservée. Pour *P. vivax*, un traitement à base de primaquine doit être instauré après la guérison du patient pour éviter les rechutes.

B . Traitements antipaludiques actuels et en développement clinique

Les alcaloïdes de quinquina (*Cinchona pubescens* ou *C. succirubra*, Rubiacées) représentent le traitement historique du paludisme en Europe. L'écorce de quinquina rouge (ou poudre des jésuites) était utilisée traditionnellement dans les Andes pour soigner les fièvres et a été importée en Europe par les missionnaires jésuites à la fin du 16^{ème} siècle. Les alcaloïdes présents dans l'écorce, la quinine et la quinidine, ont été isolés pour la première fois en 1817 par Pelletier et Caventou. L'utilisation excessive de l'écorce de quinquina, arbre endémique aux Andes qui pousse à une altitude de 1000 à 3000 m en zone tropicale, a quasiment mené à son extinction. Ce sont les hollandais qui parviennent pour la première fois à cultiver le quinquina sur l'île Java et qui détiendront le monopole de la production de quinine. En 1940, l'Allemagne nazie détruit les stocks de quinine lors du bombardement d'Amsterdam, ce qui laisse les troupes américaines et australiennes évoluant en Asie sans traitement antipaludique. L'effort de guerre mènera à la synthèse de la chloroquine par les américains, s'inspirant de la quinine et du bleu de méthylène dont l'activité avait été démontrée par les chercheurs allemands Guttman et Ehrlich. La chloroquine supplantera rapidement la quinine, son coût de fabrication étant très faible par rapport à l'extraction du produit naturel. La chloroquine a laissé entrevoir la possibilité d'éradiquer le paludisme et a mené au premier programme mondial d'éradication du paludisme de l'OMS en 1955. Cependant, l'émergence de résistance en Asie du Sud-Est à la fin des années 1950 et sa diffusion en Afrique à la fin des années 1970 ont mis fin aux efforts mis en place. La guerre froide, et notamment la guerre du Vietnam, a été un nouvel élan dans la recherche de nouveaux médicaments antipaludiques, tant sur le front américain — le *Walter Reed Institute* ayant criblé plus de 250 000

composés pour n'en sélectionner qu'un : la méfloquine (composé n°142490) — que sur le front asiatique, le criblage d'extraits utilisés en médecine traditionnelle chinoise par l'équipe du Dr Tu Youyou — prix Nobel de médecine en 2015 — ayant mené à l'isolement de l'artémisinine. L'élimination du paludisme dans la plupart des pays du nord et la fin des conflits en Asie et ont mené au désintéressement des industries pharmaceutiques pour la lutte contre le paludisme. Un nouvel essor a vu le jour avec la mise en place du second plan de lutte de l'OMS en 2000, le réinvestissement financier dû à la création de l'Initiative Présidentielle américaine contre le Paludisme (*PMI*), correspondant à une expansion historique des ressources du gouvernement américain pour la lutte contre le paludisme, à l'implication de la banque mondiale et de fondations comme la *Bill and Melinda Gates Foundation* et la mise en place de partenariats public-privé solides, qui ont permis le développement rapide de nouveaux antipaludiques ces dernières années.

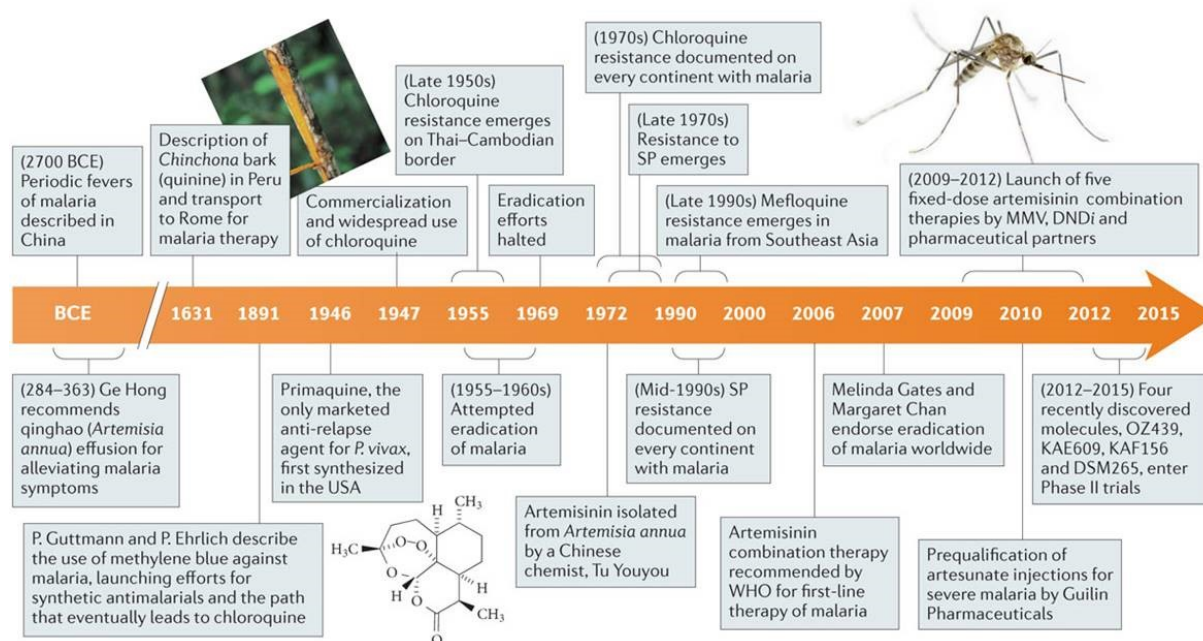


Figure 12. Historique du développement des antipaludiques et des résistances associées. D'après Wells *et al.*, 2015

1. Alcaloïdes du quinquina

La quinine a longtemps été utilisée en monothérapie et fait toujours partie de l'arsenal thérapeutique actuel, notamment dans le traitement du paludisme grave, même si l'OMS recommande depuis quelques années d'utiliser préférentiellement l'artésunate. Elle a été pendant longtemps le seul traitement disponible par voie parentérale. Les autres alcaloïdes du quinquina, la quinidine, la cinchonine et la cinchonidine possèdent une activité comparable à la quinine mais ont été moins utilisés car l'écorce de quinquina cultivé (*C. ledgeriana*) contient la quinine de façon majoritaire.

La structure de ces alcaloïdes quinoléiques (dérivant du tryptophane) contient une fonction amino-alcool aromatique dont est inspirée la méfloquine (**Figure 13**). Ces composés sont très basiques et sont

toujours administrés sous forme de sels dont certains possèdent des propriétés nécrisantes. En clinique, le chlorhydrate est le sel le plus utilisé.

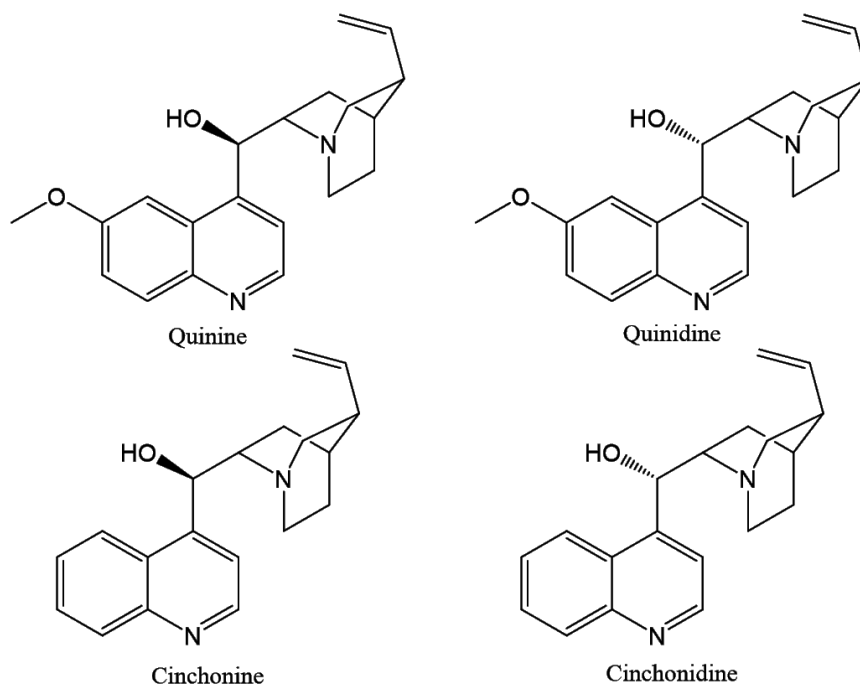


Figure 13. Structure des alcaloïdes du quinquina

La quinine possède un effet schizonticide plutôt rapide sur les parasites intra-érythrocytaires mais nécessite tout de même un traitement d'une semaine. Elle agit essentiellement sur les stades anneaux âgés et trophozoïtes. Elle présente un effet gamétocytocide chez *P. vivax* et *P. malariae* mais n'a pas d'effet sur les gamétocytes de *P. falciparum*. Elle possède également des propriétés analgésiques mais n'a pas d'effet antipyrétique. Son mécanisme d'action n'est pas connu, bien qu'elle soit souvent considérée comme ayant le même mécanisme que la chloroquine (B.3.i).

La quinine est rapidement absorbée au niveau du duodénum et présente un pic plasmatique en 1 à 3 heures. Elle est fortement liée aux protéines plasmatiques et présente une demi-vie d'élimination entre 11 et 18 heures, ce qui impose l'administration de trois doses quotidiennes.

La quinine a un indice thérapeutique faible et présente des effets secondaires fréquents comme le cinchonisme, syndrome souvent bénin regroupant acouphènes, hypoacousie, étourdissements, nausées, malaise, agitation et vision trouble et est aussi souvent responsable d'une hypoglycémie. L'intoxication grave touche les systèmes cardiovasculaire et neurologique, l'administration de charbon activé par voie orale ou sonde nasogastrique accélère son élimination. Une hypotension peut être induite par une perfusion trop rapide et une thrombose veineuse peut avoir lieu au site d'injection.

Le développement de résistances à la quinine a été très lent — son usage ayant débuté au 17^e siècle et le premier cas ayant été décrit en 1910 — et n'empêchent pas la guérison d'un paludisme grave. De

manière générale, la quinine conserve son activité mais son action est ralentie ou diminuée. Des cas de résistances ont été décrits en Asie et en Amérique du Sud mais semblent plutôt rares sur le continent africain. Aucun marqueur spécifique n'a été identifié, la résistance à la quinine étant sûrement multifactorielle. Des mutations de *pfprt*, *pfmdr1*, *pfhhe-1* et une variation du nombre de copies de *pfmdr1* pourraient jouer un rôle.

Les sept jours de traitement, comprenant trois doses quotidiennes, nécessaires à l'activité de la quinine font qu'elle a été remplacée par les CTA dont l'observance est facilitée. Cependant, la quinine reste un traitement important du paludisme, notamment chez la femme enceinte au premier trimestre ou en cas d'approvisionnement limité en CTA (Achan *et al.*, 2011; Eholié *et al.*, 2008; Gentilini, 2012; Sullivan, 2011).

2. Amino-alcools

La famille des amino-alcools comprend des composés présentant une structure inspirée de celle de la quinine (**Figure 14**). Cette classe comprend la méfloquine, la luméfantine et l'halofantrine, cette dernière n'étant plus utilisée pour cause de toxicité cardiaque trop importante (risque de torsades de pointes).

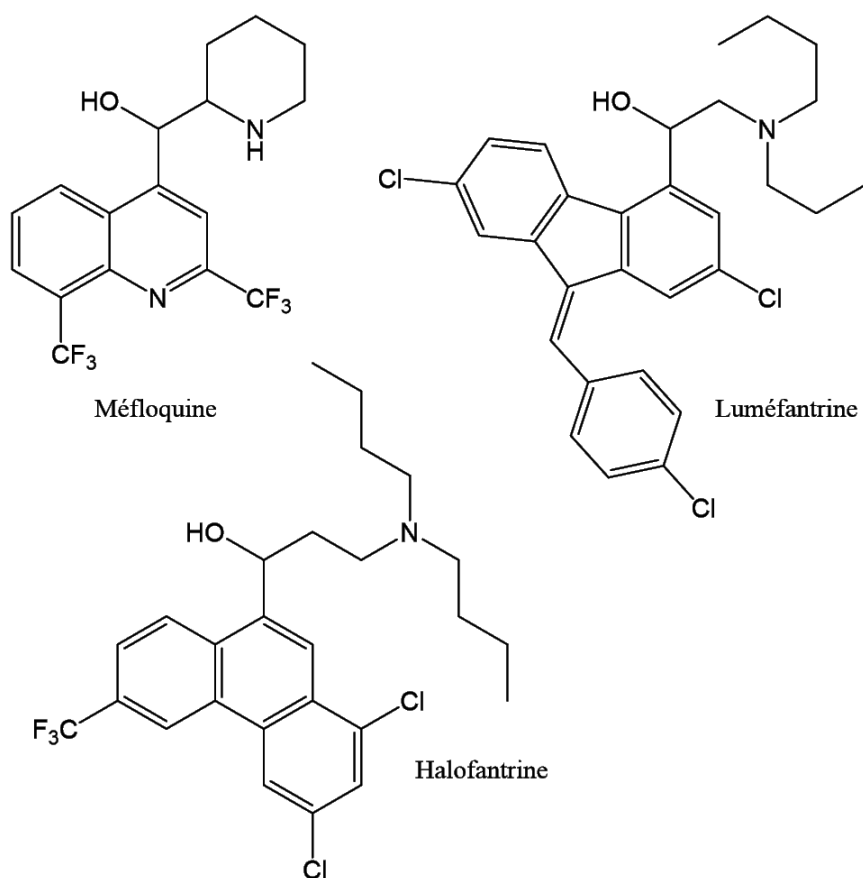


Figure 14. Structure des composés de la classe des amino-alcools

Tout comme la quinine, la méfloquine et la luméfántrine agissent essentiellement sur les stades anneaux âgés et trophozoïtes de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, bien que la luméfántrine serait également capable de cibler le stade anneau. Elles n'ont pas d'action sur les gamétocytes ni sur les formes hépatiques.

Par analogie structurale, leur mécanisme d'action est considéré comme impliquant la polymérisation de l'hème. Cependant, une étude indique que la méfloquine inhiberait également l'endocytose de l'hémoglobine et d'autres substances du cytoplasme de l'érythrocyte vers la vacuole digestive. L'effet de la luméfántrine, quant à lui, n'a pas été évalué (Hoppe *et al.*, 2004).

La méfloquine présente une demi-vie d'élimination très longue (entre 1 à 3 semaines) et est liée aux protéines plasmatiques à plus de 98 %. Son absorption est modérée mais augmente de 40 % quand la prise est concomitante à un repas. La pharmacocinétique de la luméfántrine est très variable et imprévisible, notamment son absorption. Cette dernière est augmentée si la prise est concomitante à un repas riche en lipides. La demi-vie d'élimination est variable d'un individu à l'autre (entre 24 et 48 heures) et double pour son métabolite actif, la desbutyl-luméfántrine (4 à 5 jours).

Les effets secondaires observés, en plus des troubles digestifs couramment observés pour les antipaludiques, comprennent un allongement de l'espace QT (temps qui sépare le début de la dépolarisation du myocarde ventriculaire de la fin de la repolarisation, son allongement étant lié à survenue d'arythmies ventriculaires potentiellement fatales) et pour la méfloquine la possibilité d'atteintes neuropsychiatriques.

La résistance à la méfloquine est associée à une augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1* (*multidrug resistance protein 1*) qui code pour une protéine de transport de la famille ABC (*ATP-binding cassette*), homologue de la glycoprotéine-P des cellules de mammifères induisant une multirésistance des cellules cancéreuses. Des résistances sont décrites essentiellement en Asie du sud-est. Il n'y a pas de résistance à la luméfántrine observée en clinique, les échecs thérapeutiques étant souvent imputés à la cinétique de ce médicament. Cependant, une perte d'activité est observée quand le nombre de copies du gène *pfmdr1* est augmenté. Les allèles sauvages de *pfcr1* et de *pfmdr1* induiraient également une perte de sensibilité à la luméfántrine par rapport aux allèles mutés (Ecker *et al.*, 2011; Price *et al.*, 2004, 2006).

3. 4-aminoquinoléines

La chloroquine est le médicament chef-de-file de la classe des 4-aminoquinoléines (**Figure 15**). Elle a longtemps été utilisée en monothérapie comme traitement de première intention des cas non compliqués de paludisme à *P. falciparum* car sa synthèse est facile, elle présentait une bonne efficacité clinique, une simplicité d'utilisation et un coût limité. Son efficacité est sérieusement impactée depuis l'émergence de résistances dans la quasi-totalité des régions où *P. falciparum* est prévalent : son

utilisation pour le traitement de *P. falciparum* est aujourd'hui limitée à l'Amérique Centrale. La synthèse de dérivés a permis de contourner en partie les résistances à la chloroquine. L'amodiaquine, la pipéraquline et depuis peu la pyronaridine sont associées aux dérivés de l'artémisinine dans les CTA. La ferroquine et l'AQ-13 sont actuellement en développement (phase II).

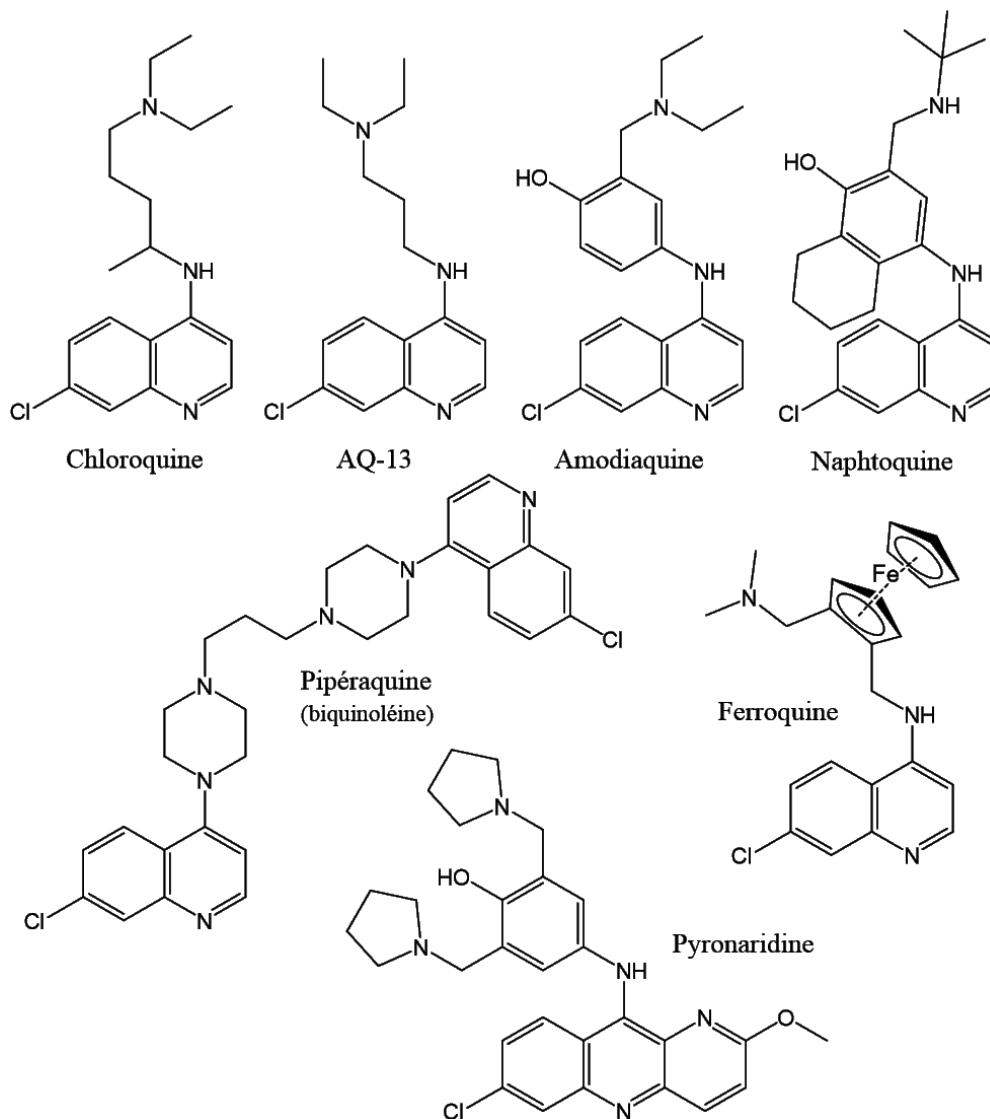


Figure 15. Chloroquine et ses dérivés 4-aminoquinoléine

i. Chloroquine

De nombreuses études de chimie médicinale ont été menées afin de développer des analogues efficaces sur les souches chloroquino-résistantes. Elles ont permis de mettre en évidence les groupements essentiels à l'activité (**Figure 16**) :

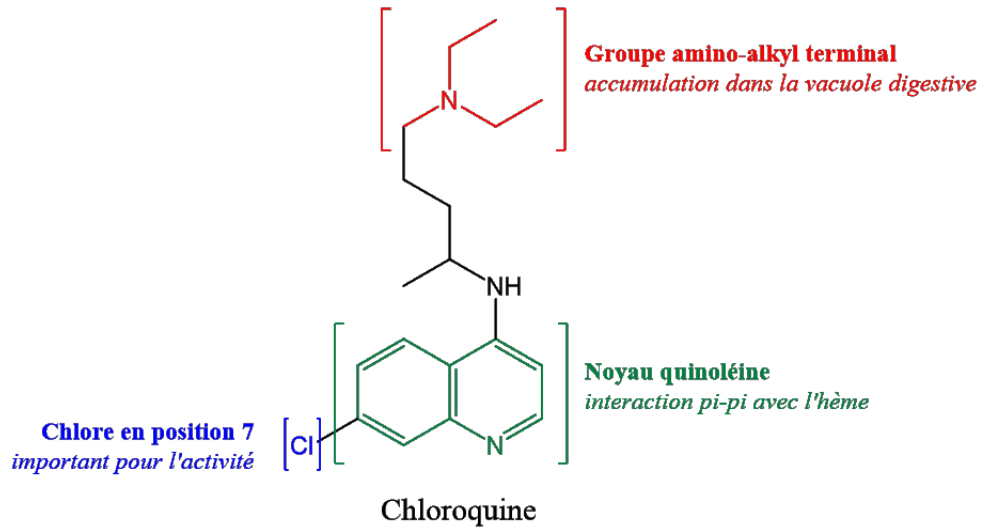


Figure 16. Relation structure-activité antipaludique de la chloroquine

La chloroquine agit sur les stades érythrocytaires mais n'est pas active sur les stades pré-érythrocytaires, sur les hypnozoïtes ou les gamétocytes matures. Elle inhibe la détoxification de l'hème en hemozoin lors de la digestion de l'hémoglobine par le parasite (**Figure 17**). La chloroquine s'accumule dans la vacuole digestive au pH acide car c'est une base faible : sous sa forme non-protonée (base) la chloroquine diffuse librement à travers les membranes tandis que sous sa forme protonée (ce qui est le cas au pH acide de la vacuole digestive) elle est séquestrée. Ainsi, sa concentration dans la vacuole digestive peut être 10 000 fois plus élevée que dans le globule rouge (O'Neill *et al.*, 2011).

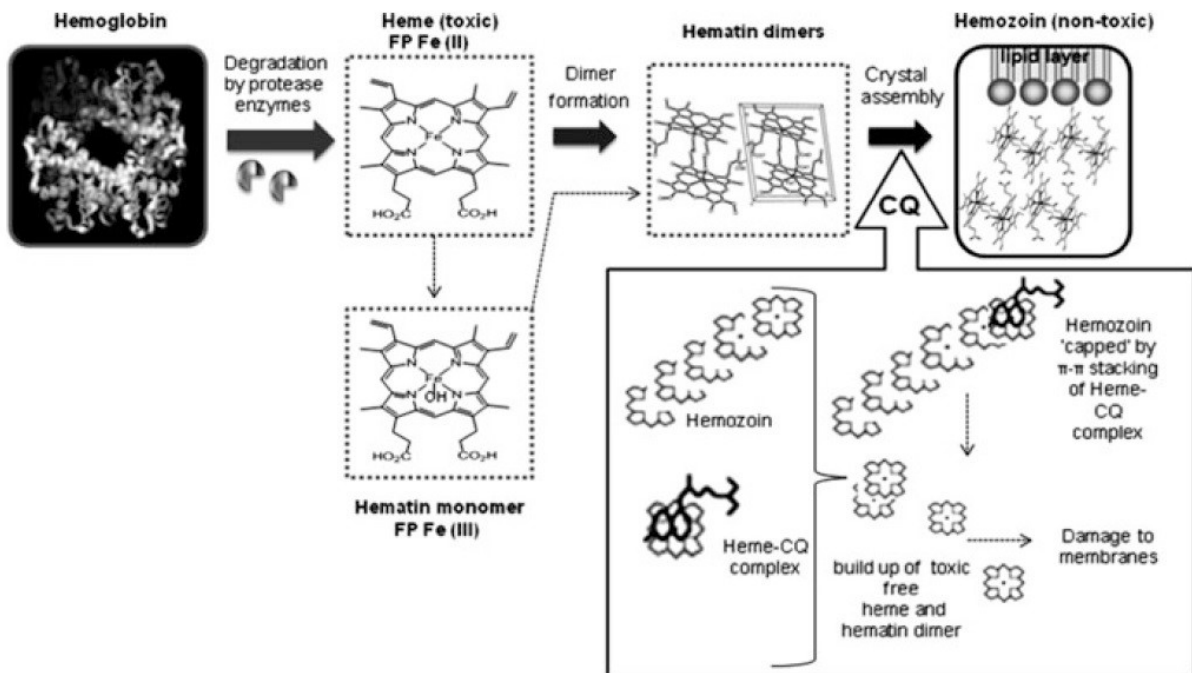


Figure 17. Mécanisme d'inhibition de la polymérisation de l'hème par la chloroquine. D'après O'Neill *et al.*, 2011

La chloroquine est bien absorbée par voie orale et présente un pic plasmatique 2 à 6 heures après administration. Elle présente également une élimination lente, ce qui lui confère une demi-vie d'élimination longue, de 10 à 30 jours.

La chloroquine est plutôt bien tolérée même si elle induit des effets secondaires fréquents : troubles gastro-intestinaux, céphalées, étourdissement, trouble de l'accommodation visuelle.

Les premières résistances à la chloroquine ont été décrites en 1957. Le mécanisme de résistance implique un accès réduit de la chloroquine à son site d'action, la vacuole digestive. Le premier marqueur qui a été mis en évidence pour la résistance à la chloroquine est *pfmdr1* muté. Il s'est avéré que ce marqueur ne joue qu'un rôle mineur dans la résistance à la chloroquine. La protéine *PfMDR1* est présente dans la vacuole digestive du parasite, avec un domaine liant l'ATP côté cytoplasmique. Ceci suggère que *PfMDR1* dirige les drogues du cytoplasme vers la vacuole digestive. La perte de cet import est avantageuse pour le parasite quand la drogue cible la vacuole digestive. *PfMDR1* transporte la chloroquine chez les souches sauvages mais des polymorphismes du gène affectent la spécificité du substrat : les variants polymorphiques de *pfmdr1* de différentes lignées résistantes sont moins efficaces pour le transport de la chloroquine. Contrairement à *pfmdr1*, la mutation de *pfcr1* sur l'acide aminé 76 (K76T) induit un mécanisme d'efflux de la chloroquine de la vacuole digestive vers le cytoplasme (Fidock et al., 2000; Sidhu et al., 2002). *Pfcr1* code pour une protéine de 49 kDa dont la fonction n'est pas connue, localisée sur la membrane de la vacuole digestive. La comparaison de séquence de cette protéine par bioinformatique a permis de la classer dans la superfamille de transporteur de métabolites. D'autres mutations ponctuelles de ce gène sont souvent associées à la mutation K76T. Ce phénotype peut être partiellement annulé par l'utilisation de vérapamil (qui bloque les canaux calciques), qui restaure l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive (Bray et al., 1998; Ecker et al., 2011).

ii. Amodiaquine

L'amodiaquine est un analogue de la chloroquine, dont le mécanisme d'action semble être similaire, mais est sujet à controverse (O'Neill et al., 1998). L'amodiaquine présente un linker phényle à la place de la chaîne carbonée de la chloroquine. Cette molécule présente une activité augmentée sur les parasites chloroquino-résistants mais le groupement aminophénol lui confère une certaine toxicité impliquant la génération d'une quinone imine réactive (toxicité hépatique, agranulocytose, **Figure 18**).

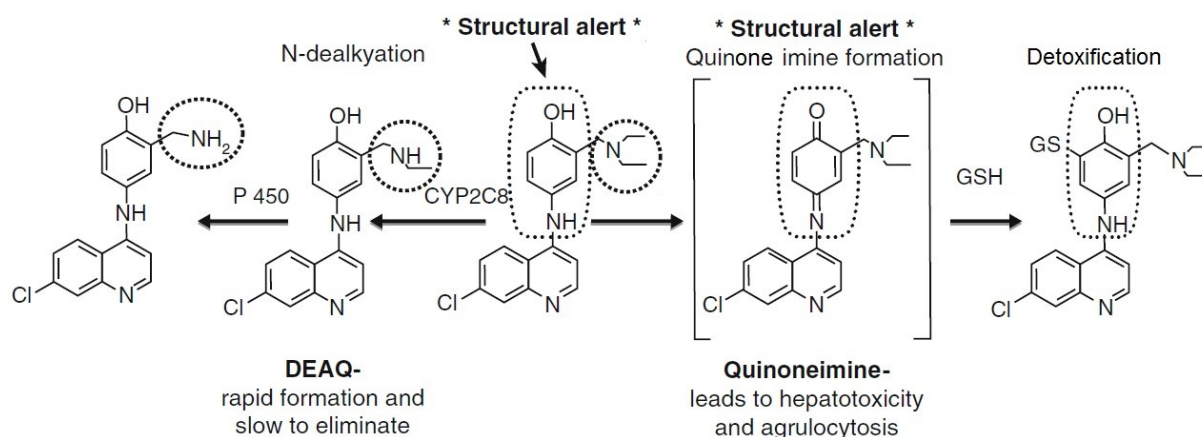


Figure 18. Métabolisme de l'amodiaquine. La désalkylation par le cytochrome 2C8 induit la formation de la déséthylamodiaquine (DEAQ), métabolite actif vis-à-vis de *Plasmodium*. La présence d'un amino-phénol induit la formation d'une quinone imine qui, si présente en concentration trop importante, dépasse les capacités de détoxification du glutathion (GSH) et induit une hépatite médicamenteuse ou une agranulocytose. D'après O'Neill *et al.*, 2011

Après la prise orale, l'amodiaquine est métabolisée à 80 % en son métabolite actif, la déséthylamodiaquine (DEAQ, **Figure 18**), sa demi-vie d'élimination étant ainsi courte (0,5 à 6 heures). La demi-vie de son métabolite actif est plus longue et dure entre 1 et 10 jours.

En plus des effets secondaires courants de type troubles gastro-intestinaux, l'amodiaquine peut induire des cas d'hépatites toxiques et d'agranulocytose qui peuvent s'avérer mortels. Sa prise est déconseillée avec les inhibiteurs de cytochrome P450.

Tout comme pour la chloroquine, la résistance à l'amodiaquine semble faire intervenir une combinaison entre les mutations de *pfmdr1* et *pfcr1*. Certains auteurs décrivent que l'association de *pfmdr1* Y1246 associée ou non aux mutations *pfmdr1* Y86 et Y184 semble impliquée dans la résistance à l'amodiaquine et aux échecs thérapeutiques au Kenya et à Zanzibar (Holmgren *et al.*, 2007), de même pour l'association de *pfcr1* T76 et *pfmdr1* Y86 au Kenya (Holmgren *et al.*, 2006). Cependant il n'y a pas pour l'instant de marqueur clairement défini pour la résistance à l'amodiaquine et le type de mutation impliquée diffère peut-être en fonction de l'origine géographique des souches de *P. falciparum* (Eholié *et al.*, 2008; O'Neill *et al.*, 2011).

iii. Pipéraquline

La pipéraquline est un dimère de quinoléine dont l'activité est conservée sur les souches résistantes à la chloroquine. La pipéraquline a été synthétisée dans les années 1960 et utilisée en Chine pour la prophylaxie et le traitement du paludisme jusque dans les années 1980. Avec le développement de résistances à la pipéraquline et le développement des dérivés de l'artémisinine, son utilisation a été réduite à partir des années 1980 (Davis *et al.*, 2005). Ces dernières années, la pipéraquline a été redécouverte et utilisée en association dans les CTA. L'efficacité, la tolérance, le profil pharmacocinétique et le faible coût de la pipéraquline en font un médicament partenaire prometteur.

L'activité conservée sur les souches chloroquino-résistantes est supposée due à l'encombrement stérique provoqué par le dimère, qui ne pourrait ainsi pas entrer dans le site actif de *pfcr*.

La pipéraquline est rapidement absorbée, présente un volume de distribution élevé et une demi-vie d'élimination de 9 jours. Elle est plutôt bien tolérée et responsable essentiellement de trouble gastro-intestinaux et de rares réactions allergiques.

Cependant, l'émergence récente de résistances à la pipéraquline en Asie du Sud-Est et tout particulièrement au Cambodge limite son utilisation dans cette zone (Leang *et al.*, 2015). Deux marqueurs de résistance ont été identifiés récemment :

- une amplification des gènes codant pour les plasmepsines 2 et 3, protéases impliquées dans la digestion de l'hémoglobine (Witkowski *et al.*, 2016)
- une mutation *E415G* sur le chromosome 13 codant pour une exonucléase putative (Amato *et al.*, 2017)

Il a également été mis en évidence que toutes les souches résistantes à la pipéraquline impliquaient la préexistence d'une résistance à l'artémisinine et une absence de résistance à la méfloquine (nombre de copie du gène *pfmdr1* égal à 1) (Duru *et al.*, 2015).

iv . Nouvelles molécules dérivées

a . Pyronaridine

La pyronaridine est un dérivé aza-acridine des 4-aminoquinoléines. Tout comme l'amodiaquine, la pyronaridine présente un groupement nitrophénol mais la présence d'une deuxième amine semblerait diminuer la formation de métabolites toxiques. La pyronaridine a été développée et utilisée en Chine depuis les années 1980 mais n'a pas été enregistrée dans d'autres pays. L'association artésunate-pyronaridine (Pyramax®) vient seulement d'être enregistrée dans certains pays dont le Cambodge. Cependant, deux études cliniques menées entre autres au Cambodge ont décrits des taux de recrudescence supérieurs à 10 % à J42 après le début du traitement. Cette recrudescence n'a pas été retrouvée ni dans le bras contrôle traité par artésunate-méfloquine, ni dans les pays limitrophes et les pays d'Afrique concernés par l'étude (Leang *et al.*, 2016; Rueangweerayut *et al.*, 2012). L'origine de la faible efficacité de cette combinaison au Cambodge n'a pas encore été déterminée et son utilisation dans ce pays doit donc être à relativiser.

b . Ferroquine

La ferroquine est un dérivé ferrocénique de la chloroquine avec laquelle il ne présente pas de résistance croisée. C'est le premier dérivé organométallique en essai clinique dans le domaine du paludisme. Le mécanisme d'action de la ferroquine paraît multiple : il semblerait que ce composé cible

les lipides, inhibe la formation de l'hémozoïne et génère des espèces réactives de l'oxygène (Dubar *et al.*, 2008).

Après une seule dose de ferroquine, la demi-vie d'élimination est d'environ 16 jours pour la ferroquine et 31 jours pour son principal métabolite, la desméthylferroquine (Supan *et al.*, 2012). La concentration plasmatique de ferroquine reste supérieure à sa CI_{99} pendant environ 20 jours (CI_{99} déterminée autour de 13 ng/ml), ce qui est intéressant pour limiter l'apparition de résistances.

L'association ferroquine-artésunate semble être efficace et sans effets secondaires graves selon un essai clinique de phase II. Le développement de cette combinaison va être arrêté et remplacé par l'association OZ439-ferroquine combinant deux médicaments nouveaux (Held *et al.*, 2015). Cette association est actuellement en cours d'étude (*ClinicalTrials.gov identifier*: NCT02497612).

c. AQ-13

L'AQ-13 est un dérivé à courte chaîne de la chloroquine (chaînes de 3 et 4+1 atomes de carbones, respectivement) qui ne présente pas de résistances croisées avec la chloroquine (De *et al.*, 1996; Ridley *et al.*, 1996). Une étude de phase I a permis de conclure à la similarité des profils pharmacocinétique et de toxicité de ces deux molécules (Mzayek *et al.*, 2007). Une étude de phase II comparant l'efficacité et la sécurité d'emploi de l'AQ-13 en comparaison avec la combinaison artémether-luméfantine est actuellement en cours (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT01614964).

d. Naphtoquine

La naphtoquine est un dérivé de l'amodiaquine, dont l'activité en combinaison avec l'artémisinine en traitement d'un jour (2 doses) dans l'accès simple à *P. falciparum* est supérieure à un traitement de 3 jours de l'association artémether/luméfantine (6 doses, 100% d'efficacité à J28 contre 98.4% respectivement). Cette association est actuellement en phase III d'essais cliniques (Toure *et al.*, 2009).

4. 8-aminoquinoléines

Les 8-aminoquinoléines sont une classe importante dans l'arsenal antipaludique étant donné qu'elles sont efficaces contre les formes hépatiques de *Plasmodium* et notamment les formes hypnozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale*, évitant ainsi les rechutes. De plus, elles sont également actives sur les gamétocytes et notamment les formes tardives (IV-V) et les oocystes, la primaquine à faible dose étant recommandée actuellement pour prévenir la transmission. Cependant, cette classe peut induire une hémolyse sévère chez les patients déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDd), cette déficience étant présente avec une forte incidence en zone palustre (Waters and Edstein, 2011).

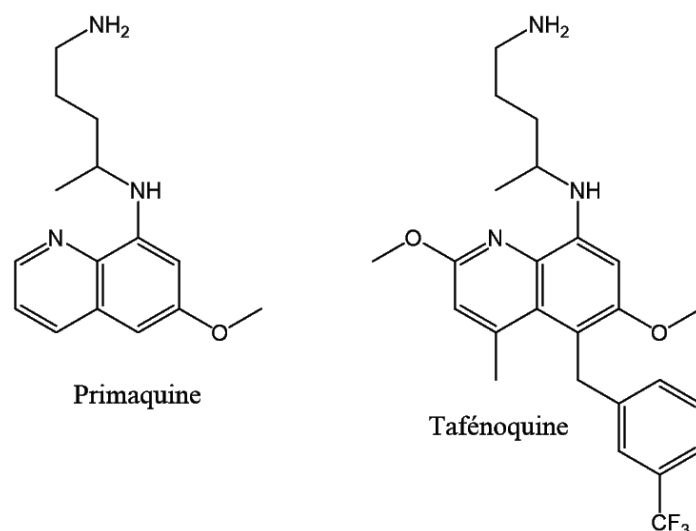


Figure 19. Structure des composés de la classe des 8-aminoquinoléines.

i. Primaquine

La primaquine a été découverte en 1946 et a été utilisée depuis pour traiter les réactivations de *P. vivax* et *P. ovale*. Elle a été utilisée en prophylaxie « causale », c'est-à-dire ciblant le cycle hépatique et évitant ainsi l'évolution vers le cycle érythrocytaire, en traitement des rechutes (ciblant la forme hypnozoïte) et en traitement des infections sanguines à *P. vivax* et *P. ovale*. La primaquine cible essentiellement les stades hépatiques de *Plasmodium* et est beaucoup moins efficace vis-à-vis des formes sanguines asexuées, bien que celles de *P. vivax* soient plus sensibles que les autres espèces. Il semblerait que le schéma posologique utilisé pour traiter les formes hypnozoïtes influence peu l'efficacité du traitement tant que la dose totale administrée est suffisante. Cependant, l'étalement de la dose sur une plus longue période permet de limiter l'hémolyse chez les patients G6PDd.

Le mécanisme d'action de la primaquine n'est pas connu mais pourrait impliquer la mitochondrie, menant à un gonflement et des changements structuraux de la membrane interne responsables d'un dysfonctionnement de cette organelle. L'induction d'un stress oxydant a également été proposé pour expliquer son activité, cependant cela n'explique pas la faible activité de la primaquine sur les formes sanguines.

La primaquine est rapidement absorbée (pic plasmatique à 2 heures) et présente une biodisponibilité de 96 %. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 6 heures. Elle est rapidement métabolisée en intermédiaires réactifs, responsables de l'hémolyse chez les patients G6PDd. Ces métabolites induisent la libération de radicaux libres, de peroxyde d'hydrogène et d'anion superoxyde qui mènent à l'hémolyse des hématies du patient déficient en G6PD.

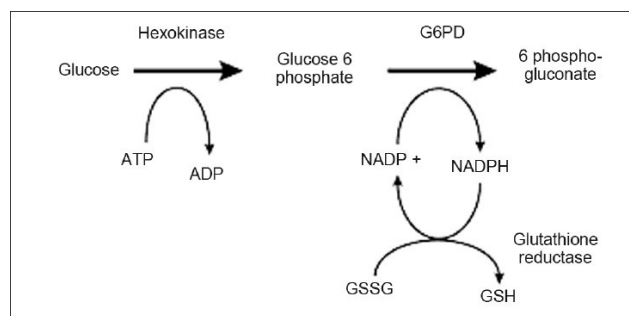


Figure 20. Voie du pentose-phosphate, d'après Chowdhry *et al.*, 2012

L'anémie hémolytique est un effet secondaire grave qui limite l'utilisation de primaquine à grande échelle. Les globules rouges, en particulier ceux infectés par *Plasmodium*, sont sujets à un stress oxydant. Le glutathion réduit (GSH) est nécessaire à la détoxification des radicaux libres. Le glutathion oxydé (GSSG) est réduit en GSH par la glutathion-réductase et le NADPH. Etant donné que les globules rouges n'ont pas de mitochondrie, la voie du pentose-phosphate est la seule source de NADPH (**Figure 20**). Chez les patients G6PDd, la concentration en NADPH n'est pas suffisante pour ramener le niveau de GSH à la normale, le système antioxydant étant ainsi compromis. Les globules rouges des patients G6PDd sont ainsi plus sensibles au stress oxydant. La primaquine est aussi responsable de méthémoglobinémie et de troubles gastro-intestinaux (Waters and Edstein, 2011).

ii. Tafénoquine

La tafénoquine est actuellement en phase II d'évaluation clinique. Elle présente une demi-vie d'élimination beaucoup plus longue que celle de la primaquine (14 jours) et est aussi efficace pour traiter les hypnozoïtes qu'en prophylaxie pour éviter le développement hépatique de *Plasmodium*. Elle est plus efficace que la primaquine pour traiter l'infection sanguine chez un modèle simien et conserve son activité vis-à-vis des gamétocytes et des oocystes. Cependant, la tafénoquine induirait la même toxicité que la primaquine chez les patients G6PDd, limitant ainsi son utilisation à grande échelle (Waters and Edstein, 2011).

5. Antifolates

Les antifolates inhibent deux enzymes de la voie de synthèse de l'acide folique : la dihydroptéroate synthétase (DHPS) en amont (sulfadoxine, dapsonne) et la dihydrofolate réductase (DHFR) en aval (proguanil, chlorproguanil, pyriméthamine, **Figure 21**). Les folates sont des cofacteurs cellulaires importants pour la production de désoxythymidilate (dTMP) et donc pour la synthèse d'ADN. Cette voie métabolique est cruciale pour le parasite car celui-ci dépend uniquement de la synthèse *de novo* de dTMP et n'est pas capable de le soustraire à l'hôte. La combinaison de ces inhibiteurs est synergique et améliore la tolérance et l'efficacité des inhibiteurs de DHPS, c'est pourquoi ils sont toujours utilisés en association.

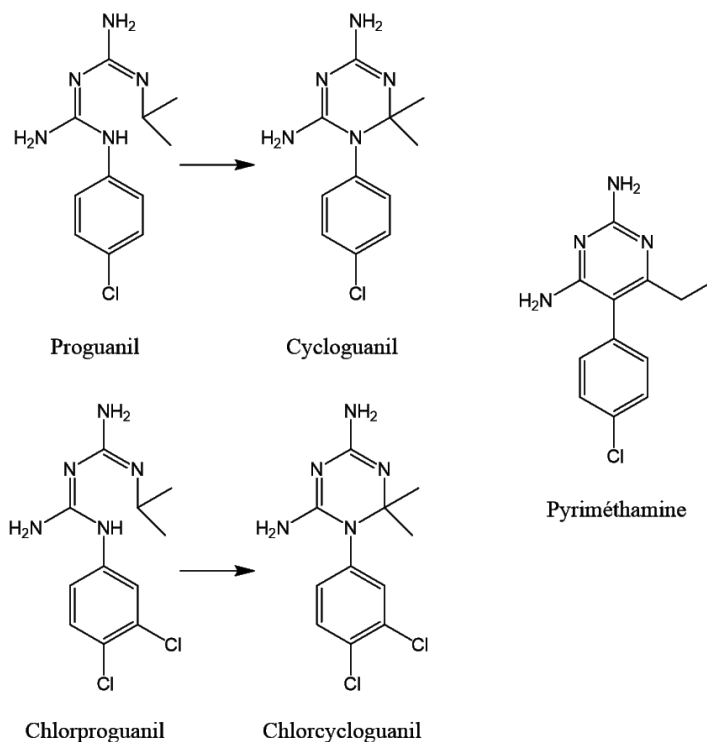
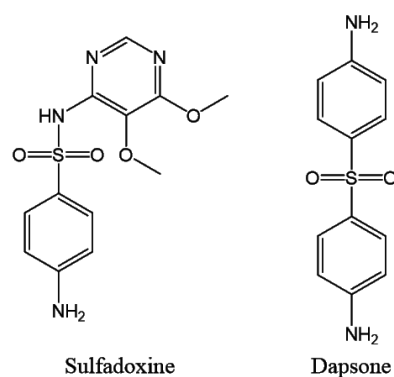
Inhibiteurs de la dihydrofolate réductase**Inhibiteurs de la dihydroptéroate synthétase**

Figure 21. Inhibiteurs de la voie de synthèse de l'acide folique.

Le proguanil est le premier antifolate qui a été découvert. Ce composé est métabolisé en sa forme active, le cycloguanil. Il a été utilisé seul en prophylaxie, cependant l'apparition de résistances à la pyriméthamine (mutation de DHFR) induit une perte d'efficacité de ce composé. L'association proguanil/dapsone/artesunate a été évaluée en tant qu'ACT mais a été abandonnée pour cause de faible efficacité du cycloguanil et de la toxicité élevée de la dapsone. Le proguanil est aujourd'hui utilisé en association avec l'atovaquone, essentiellement en prophylaxie, étant donné leur association synergique. Dans les zones de résistance à la pyriméthamine, l'effet est dû essentiellement à la synergie d'action de ces deux composés vis-à-vis du transport d'électrons de la chaîne mitochondriale et non à l'inhibition de la DHPS par le cycloguanil (Nzila, 2011).

La pyriméthamine est associée à la sulfadoxine pour le traitement du paludisme non compliqué. Cette association est aujourd'hui combinée à l'artésunate pour augmenter son efficacité. La pyriméthamine et la sulfadoxine présentent une demi-vie d'élimination longue, supérieure à 80 heures. La pyriméthamine avait également été associée à la dapsonne, dont l'élimination est beaucoup plus rapide (environ 24 heures) expliquant la faible efficacité de cette association, l'effet synergique étant rapidement perdu. L'association pyriméthamine/sulfadoxine est également utilisée en traitement préventif intermittent chez la femme enceinte en une prise au 2^e et 3^e trimestre de grossesse car elle permet de réduire l'infection du placenta, l'anémie maternelle et d'augmenter le poids de naissance. Bien que cette activité soit conservée dans les zones de faibles résistances, son efficacité est compromise dans les zones où les parasites sont fortement résistants à cette association (Nzila, 2011).

Les résistances à ces traitements sont dues à des mutations du gène *dhfr* :

- S108N, N51I, C59R et I164L pour la résistance à la pyriméthamine. La résistance n'implique pas forcément toutes ces mutations, cependant ces quatre mutations confèrent une forte résistance et sont fortement prévalentes en Asie du sud-est, le mutant triple (sans la mutation I164L) étant essentiellement prévalent en Afrique.
- S108T et A16V pour le cycloguanil ; certaines mutations de *dhfr* induisant une résistance à la pyriméthamine réduisent également l'efficacité du cycloguanil.

Des mutations ponctuelles du gène *dhps* sont aussi observées et augmentent la résistance (A437G, K540E, A437K, A581K) (Ecker *et al.*, 2011; Nzila, 2011).

6 . Endoperoxydes

i . Dérivés de l'artémisinine

L'artémisinine est une molécule d'origine naturelle isolée d'*Artemisia annua* (Astéracées), plante utilisée traditionnellement contre les fièvres en Chine. Depuis, des dérivés hémisynthétiques ont été réalisés afin d'optimiser leur absorption, mais le métabolite actif, la dihydroartémisinine, est commun à tous ces dérivés (**Figure 22**). C'est aujourd'hui la classe thérapeutique la plus utilisée et ces dérivés jouent le rôle de médicament d'action rapide dans les combinaisons à base d'artémisinine car ils permettent de réduire la charge parasitaire d'un facteur 10 000 toutes les 48 heures. Ces composés sont les plus efficaces actuellement mais présentent une demi-vie d'élimination plasmatique d'environ 1 à 3 heures. Ainsi, ils sont associés à un médicament partenaire qui permet d'éviter les recrudescences observées après une monothérapie de cinq jours. Les dérivés de l'artémisinine sont en général bien tolérés mais peuvent toutefois induire une baisse du taux de réticulocytes et une augmentation transitoire des transaminases hépatiques.

Les dérivés de l'artémisinine sont des lactones sesquiterpéniques qui comportent un pont endopéroxyde, déterminant majeur de leur activité. Ils sont actifs quasiment tout au long du cycle

érythrocytaire, bien que l'activité soit perdue lors d'incubations courtes (inférieures à 6 heures) sur le stade anneau. Cependant, le stade anneau jeune entre 2 et 4 heures post-invasion présente la même sensibilité que le stade trophozoïte lors d'incubations courtes (Klonis *et al.*, 2013). Ils sont également actifs sur les gamétocytes jeunes (I-III).

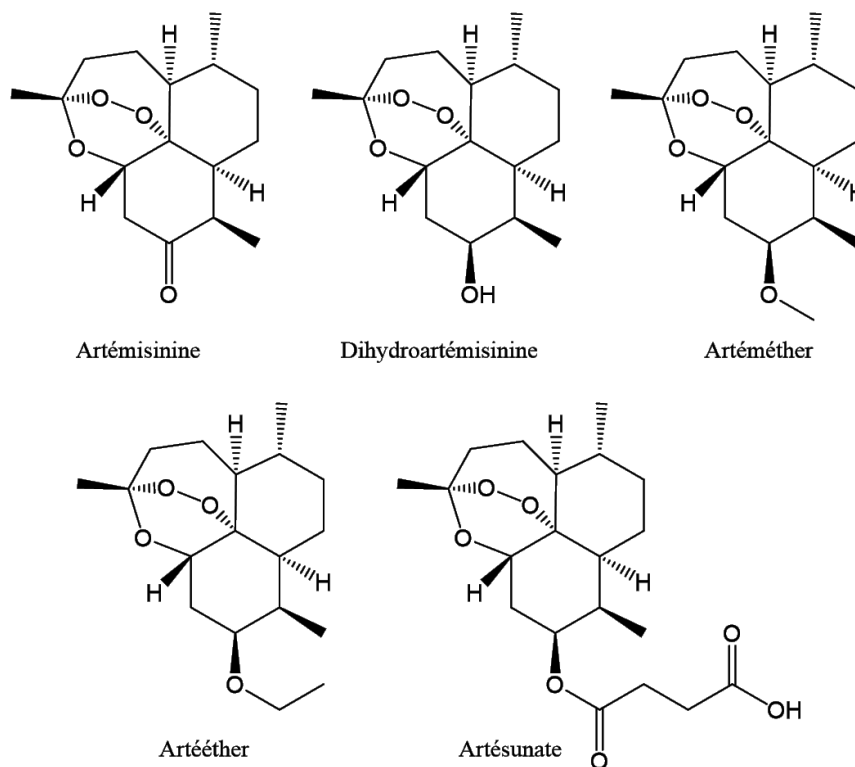


Figure 22. Artémisinine et ses dérivés

Leur mécanisme d'action n'est pas encore totalement compris mais semble impliquer la présence d'hème, dont le fer catalyse l'ouverture du pont endopéroxyde et mène à la génération d'espèces radicalaires et induit ainsi un stress alkylant pour le parasite. Le catabolisme de l'hémoglobine menant à de fortes concentrations en Fe^{2+} permettrait d'activer l'artémisinine au stade trophozoïte. Cependant, celle-ci est également active au stade anneau jeune et perd une partie de son activité au stade anneau plus âgé. Il semblerait que l'hème produit par le parasite puisse également activer l'artémisinine ce qui expliquerait son action sur les stades plus jeunes. Il est aussi possible que le catabolisme de l'hémoglobine débute très tôt dans le cycle du parasite étant donné que l'activité de l'artémisinine peut être réduite en présence d'inhibiteur de falcipaines (qui dégradent l'hémoglobine) au stade trophozoïte et au stade anneau jeune. De plus, des chélateurs du fer ont un effet antagoniste moins prononcé que les inhibiteurs de falcipaines avec l'artémisine, ce qui suggère que le fer contenu dans l'hème activerait principalement l'artémisinine par rapport au fer libre.

Une fois activée, la forme radicalaire de l'artémisinine va réagir de façon rapide avec les protéines présentant des sites nucléophiles (comme les sites actifs d'enzyme), ainsi qu'avec les lipides insaturés de la membrane et l'hème. 70 à 125 protéines ont été identifiées comme cibles d'alkylation, mais ces

protéines sont également les plus abondantes dans des études de protéomique non ciblée au stade trophozoïte. Ainsi, ces protéines peuvent contenir des cibles spécifiques de l'artémisinine, mais il est également possible que la mort du parasite ait lieu après un dommage généralisé de nombreuses protéines. De plus, le niveau de protéines ubiquitinylées augmente après un traitement par artémisinine ce qui suggère un dommage protéique généralisé. La protéine phosphatidylinositol-3-kinase de *Plasmodium* (*Pf*PI3K) a également été proposée en tant que cible de l'artémisinine, notamment au stade anneau jeune. La PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol (PI) pour produire du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) ; le traitement par artémisinine inhibe cette production. Cette kinase semble jouer un rôle dans la régulation de l'endocytose d'hémoglobine, et l'artémisinine inhibe ce phénomène d'endocytose, de même que la wortmannine, inhibiteur connu de PI3K (Tilley *et al.*, 2016).

Des résistances ont été mises en évidence au Cambodge en 2008 (Noedl *et al.*, 2008) et ont été décrites régulièrement depuis en Asie du sud-est. La résistance aux dérivés de l'artémisinine est définie par un temps de clairance parasitaire supérieur à trois jours en clinique, des recrudescences étant observées après traitement. Un marqueur moléculaire a été défini en 2015 : il s'agit d'une mutation du gène *kelch* au niveau du domaine en hélice (*propeller-domain*, à partir de l'acide aminé 442), présent sur le chromosome 13 (Straimer *et al.*, 2015). Étonnamment, plusieurs populations présentant des mutations différentes sur le même gène semblent avoir émergé indépendamment en Asie. C'est notamment le cas au Cambodge où les mutations R539T, I543T et C580Y coexistent, les deux premières conférant une résistance plus élevée mais étant moins prévalentes, vraisemblablement à cause d'un coût plus élevé pour la prolifération ou la transmission du parasite. L'étude multicentrique KARMA (*K13 Artemisinin Resistance Multicenter Assessment*) a permis d'identifier 108 mutations du gène *kelch13*. Ces mutations étaient très différentes en fonction de l'origine géographique de l'étude : dans la région du grand Mékong (Cambodge, Vietnam, Laos) la mutation dominante est C580Y (50%) tandis que plus au nord (Thaïlande, Myanmar, Chine) la mutation F446I est majoritaire (20%). Parmi les rares mutations observées en Afrique, A578S est la plus présente mais ne semble pas induire de résistance. Les mutations de *kelch13* semblent induire une cascade de phosphorylations qui vont provoquer l'arrêt de la synthèse protéique et mener à un phénomène de quiescence. De plus, le parasite serait capable de mieux résister au stress alkylant, en limitant l'ubiquitination de ses protéines. Contrairement aux autres composés où le degré de résistance est mesuré par rapport à une perte d'activité *in vitro* (CI₅₀ augmentée, Concentration Inhibitrice 50 définie comme la concentration inhibant 50% de la croissance du parasite), les CI₅₀ obtenues *in vitro* ne sont pas corrélées à la réussite ou non du traitement. De plus, seules les formes anneaux jeunes semblent résistantes aux dérivés de l'artémisinine. Un test phénotypique, le *ring stage survival assay*, basé sur la pharmacocinétique des dérivés de l'artémisinine, a été mis au point à l'Institut Pasteur du Cambodge afin de permettre la surveillance de

l'expansion des résistances sans avoir recours à la biologie moléculaire et donc plus adapté au travail de terrain (Karunajeewa, 2011; Straimer *et al.*, 2015; Tilley *et al.*, 2016; Witkowski *et al.*, 2013).

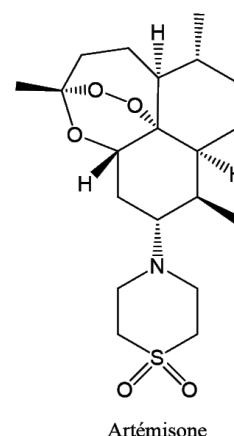
La présence de résistances croissantes en Asie aux dérivés de l'artémisinine et/ou aux médicaments partenaires conduit à une multiplication des échecs thérapeutiques dans cette zone. Le fait que les souches résistantes à la pipéraquline impliquent la préexistence d'une résistance à l'artémisinine et une absence de résistance à la méfloquine a mis en exergue l'importance de l'utilisation d'une trithérapie dihydroartémisinine-pipéraquline-méfloquine dans cette région, un essai clinique est actuellement en cours (*ClinicalTrials.gov identifier*: NCT02612545).

ii. Nouveaux endoperoxydes

Le développement de composés présentant un mécanisme d'action similaire à l'artémisinine mais une élimination prolongée devrait permettre de conserver l'action rapide tout en éliminant les parasites en dormance, étant donné que le composé est présent plus longtemps dans le sang.

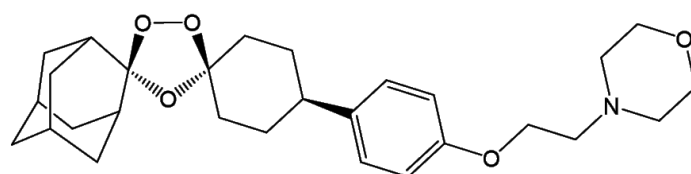
a. Artémisone

Afin de limiter l'instabilité métabolique de l'artémisinine et d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques, des dérivés aminoalkyl ont été synthétisés. Un de ces dérivés, qui présente un groupement sulfonique a une activité *in vivo* sept fois supérieure à celle de l'artésunate vis-à-vis d'une souche de *Plasmodium yoelii* résistante à l'artémisinine. Quand l'artémisone a été incubée en présence de microsomes humain, la dihydroartémisinine n'était pas présente après 30 minutes d'incubation ce qui prouve que ce composé est plus stable que l'artémisinine. Une étude clinique d'efficacité de l'association artémisone-méfloquine devait avoir lieu au Cambodge mais n'a pas reçu les autorisations nécessaires à sa mise en place (*ClinicalTrials.gov identifier*: NCT00936767).



b. Ozonides (1,2,4-trioxolanes)

De nombreux efforts ont été déployés afin de développer de nouveaux endoperoxydes, présentant une action rapide comme les artémisines mais avec une pharmacocinétique optimisée. L'OZ277 ou Artérolane est le premier composé de la classe à être entré en phase clinique. Cependant, la demi-vie de cette molécule n'est que peu améliorée par rapport à celle de l'artémisinine. OZ439 ou Artéfénomel est le composé le plus aboutit de cette nouvelle classe d'endoperoxydes car son activité *in vitro* est de l'ordre de celle de l'artémisinine (nM) et il présente en plus une pharmacocinétique optimisée (biodisponibilité de 76 % per os, demi-vie d'élimination de 1380 min versus 40 min pour la DHA, souris Swiss impaludées par *P. berghei* ANKA). De plus, c'est le seul composé connu qui permet un traitement radical chez la souris impaludée après une seule dose de 30 mg/kg (Charman *et al.*, 2011).

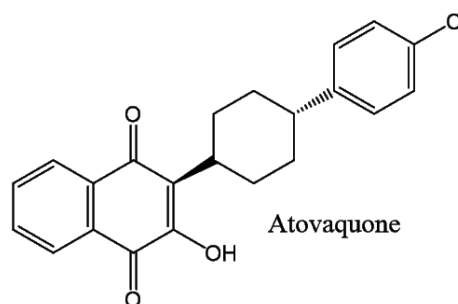


OZ439 ou artéphénomel

Un essai clinique de phase II a permis de mesurer la demi-vie de clairance parasitaire de l'OZ439 : elle s'étale entre 4,1 et 5,6 heures pour *P. falciparum*. Aucun effet secondaire grave n'a été mis en évidence et la demi-vie d'élimination longue obtenue chez la souris a été confirmée chez l'humain, suggérant une possible utilisation en monodose (Phyo *et al.*, 2016). De plus, ce composé conserve son activité *in vitro* vis-à-vis de parasites résistants à l'artémisinine (Baumgärtner *et al.*, 2017). Des études ont été mises en place pour évaluer l'activité de l'OZ439 en combinaison avec la pipéraquline (terminée, en attente de publication des résultats, NCT02083380) et la ferroquine (en cours, NCT02497612).

7. Naphtoquinones

L'atovaquone est le seul représentant de cette classe. Elle est utilisée essentiellement en prophylaxie en association au proguanil, cette association pouvant également être utilisée au même titre que la quinine-doxycycline en cas d'échecs thérapeutiques et en absence d'alternative thérapeutique, notamment dans les zones de résistances élevées comme c'est le cas au Cambodge.



Atovaquone

L'atovaquone agit en ciblant le complexe *bcl* de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui inhibe le transport des électrons et donc la synthèse d'ATP. La différence structurale du complexe *bcl* de *Plasmodium* avec celui des cellules humaines procure une certaine sélectivité à l'atovaquone.

L'absorption de l'atovaquone est améliorée par la prise d'un repas riche en graisse, elle présente une demi-vie d'élimination de 2 à 3 jours chez l'adulte et est fréquemment responsable d'effets secondaires digestifs.

Elle est toujours utilisée en association étant donné que lors d'essais cliniques en monothérapie, une recrudescence parasitaire était observée chez 30 % des patients, vis-à-vis desquels l'atovaquone était 1000 fois moins efficace. La résistance à l'atovaquone est liée à une mutation du gène codant pour la cible, en position 268 (Y268S/C/N, cytochrome b). Cette résistance annule également l'effet synergique observé avec le proguanil (Ecker *et al.*, 2011; Eholié *et al.*, 2008; Vaidya, 2011).

8. Antibiotiques

Les antibiotiques — hors antifolates — ciblent essentiellement l'apicoplaste, un chloroplaste relictuel dont la fonction est essentielle à la survie de *Plasmodium*. De façon générale, ils ne sont pas très actifs et agissent de façon lente, mais utilisés en combinaison avec des médicaments d'autres classe, ils permettent de diminuer le taux d'échecs thérapeutiques même pour des traitements courts. De plus, ils peuvent être utilisés chez la femme enceinte et l'enfant en bas âge.

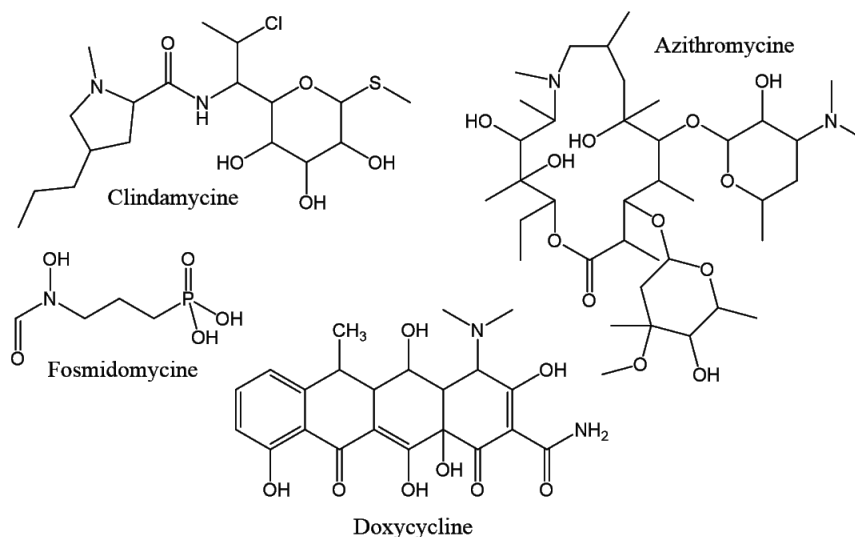


Figure 23. Structure des principaux antibiotiques utilisés pour traiter le paludisme ou en développement (Fosmidomycine)

i. Lincosamides

La clindamycine est active vis-à-vis de plusieurs apicomplexes dont *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii* et *Babesia microti*. Cet antibiotique inhibe la synthèse protéique chez les bactéries en se liant à la sous-unité 50S du ribosome. Chez les Apicomplexes, elle cible l'apicoplaste dont la division ne peut pas avoir lieu et qui mène à un phénomène de « mort retardée ». Ce mécanisme a été confirmé par l'apparition de parasites résistants qui présentent une mutation du gène codant pour l'ARN 23S plastidial et qui présentent une perte de sensibilité de plus de 100 fois par rapport aux souches sauvages.

La clindamycine est utilisée en combinaison avec la quinine. Son absorption est élevée, elle est fortement liée aux protéines plasmatiques et rapidement éliminée (demi-vie d'environ 2-3 heures). Elle est fréquemment responsable d'effets secondaires digestifs et de rashes cutanés (Krishna and Staines, 2011).

ii. Tétracyclines

La doxycycline inhibe la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Tout comme la clindamycine, son action est lente et implique l'apicoplaste et un phénomène de mort

retardée. Elle est utilisée en monothérapie pour la prophylaxie de l'infection sanguine à *Plasmodium*, mais également en association avec la quinine pour augmenter le taux de guérison.

Sa demi-vie d'élimination étant plus longue que celle de la clindamycine (18 heures) elle est plus pratique d'utilisation. Cependant son absorption est diminuée avec la prise alimentaire, notamment les laitages. Elle n'est pas recommandée chez la femme enceinte et les enfants de moins de 8 ans (car elle peut entraîner une coloration irréversible des dents) et induit une photosensibilisation (Krishna and Staines, 2011).

iii . Macrolides

L'azythromycine agit de la même façon que la clindamycine en se liant à la sous-unité 50S du ribosome bactérien. Tout comme les deux autres antibiotiques, elle agit lentement, son effet étant retardé. Elle peut être utilisée chez la femme enceinte et les enfants en bas âge mais son coût élevé limite son utilisation en zone d'endémie.

L'azythromycine a une biodisponibilité faible de 37 % qui est encore réduite de moitié en cas de prise alimentaire. Elle présente une élimination lente car elle est fortement distribuée dans les tissus (demi-vie d'environ 70 heures). Elle est plutôt bien tolérée et présente des effets secondaires gastro-intestinaux peu fréquents (Krishna and Staines, 2011).

iv . Inhibiteur de la voie du MEP

La fosmidomycine agit également sur l'apicoplaste mais *via* un mécanisme différent : elle cible la voie métabolique des isoprénoïdes et induit ainsi un effet rapide contrairement aux autres antibiotiques utilisés dans le traitement du paludisme.

La fosmidomycine est faiblement absorbée (25%) et présente une demi-vie d'élimination courte (environ 2 heures) qui est légèrement prolongé chez l'individu impaludé (3,4 heures). Des études en monothérapie ont mis en évidence des taux de recrudescence élevés après traitement. Un essai clinique est actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de la combinaison fosmidomycine-pipéraquine (NCT02198807), cette dernière ayant une demi-vie d'élimination longue qui permettrait d'éliminer les parasites restants. Cependant, l'expérience des CTA a montré que la combinaison de deux médicaments qui possèdent des propriétés pharmacocinétiques différentes peut mener à la sélection de parasites résistants (Krishna and Staines, 2011).

9 . Nouvelles classes d'antipaludiques

Il y a actuellement quatre nouvelles classes d'antipaludiques en phase II d'études cliniques, les imidazolopipérazines représentées par le composé KAF156, les inhibiteurs de *Pf*ATP4 représentés par la cipargamine et le composé (+)-SJ733, les inhibiteurs de dihydro-orotate déshydrogénase (DHODH) dont le chef-de-file est le composé DSM-265 et enfin les inhibiteurs de l'incorporation de choline représentés par l'Albitazolium.

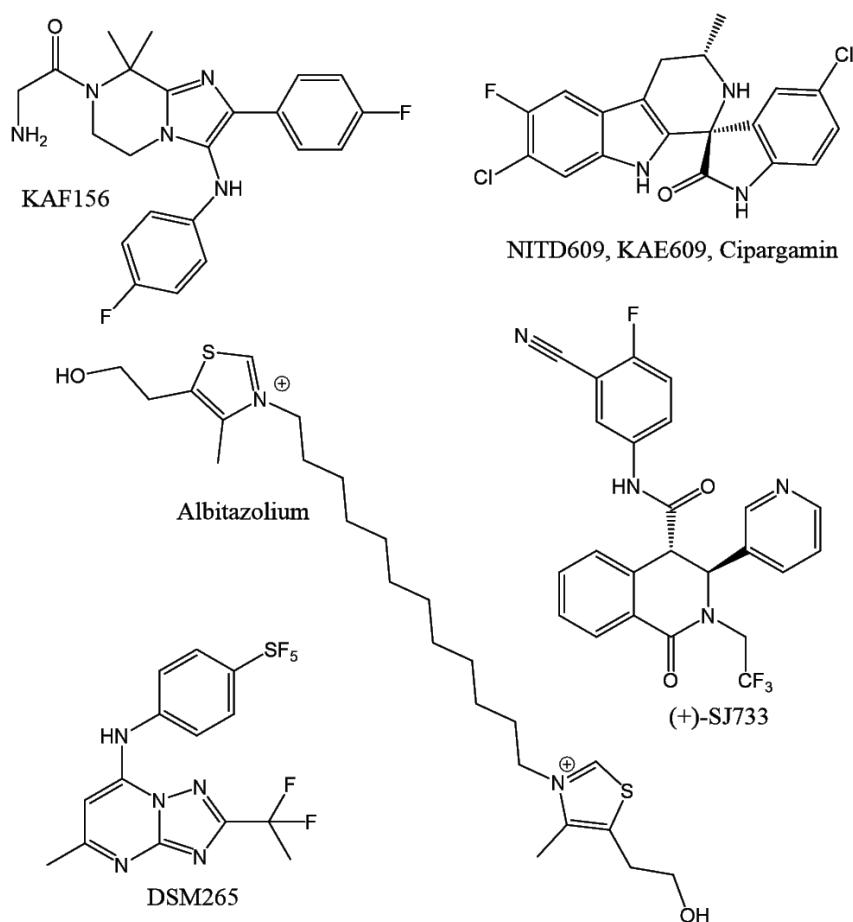


Figure 24. Nouveaux antipaludiques en développement issus de nouvelles classes chimiques.

i. Imidazolopipérazine (KAF156, Novartis)

KAF156 est le premier représentant de la classe des imidazolopipérazines. Il agit sur tous les stades du parasite, dont le stade hépatique et les gamétocytes et a une activité conservée vis-à-vis de souches et isolats de *P. falciparum* multi-résistants ainsi que d'isolats de *P. vivax*. Son efficacité a été évaluée en clinique soit par un traitement de trois jours (400 mg/j) chez les patients présentant un paludisme non compliqué à *P. falciparum* ou *P. vivax*, soit en monodose de 800 mg chez les patients présentant un paludisme à *P. falciparum*. Il permet d'éliminer rapidement le parasite quelle que soit l'espèce considérée et le statut de résistance des parasites (*pfmdr*, *pfcr*, et *K13*), en environ 24 heures chez les patients infectés par *P. falciparum* et traités pendant trois jours ou environ 48 heures chez les patients infectés par *P. vivax* ou traités en monodose. Parmi les 21 patients traités en monodose, un a été réinfecté et sept ont présenté une recrudescence. La demi-vie d'élimination du composé est d'environ 40 heures dans les bras traités pendant trois jours et 48 heures dans le bras traité en monodose à une dose plus élevée. Le traitement en monodose induisait également plus d'effets secondaires, notamment des nausées et vomissement et une augmentation transitoire des transaminases (Kuhlen *et al.*, 2014; White *et al.*, 2016). La cible de ce composé n'est pas connue mais la sélection de mutants résistants a notamment permis de mettre en évidence des mutations au sein du gène *pfcarl* (*P. falciparum* *Cyclic Amine Resistance Locus*) dont la fonction n'est pas connue (Meister *et al.*, 2011).

ii . Inhibiteurs de PfATP4

PfATP4 est un transporteur présent sur la membrane plasmique du parasite qui lui permet de maintenir une concentration cytosolique faible en sodium, et ce malgré la concentration importante présente dans le globule rouge après que *Plasmodium* ait exporté des protéines permettant l'afflux non régulé d'ions et de nutriments dans la cellule infectée. Diverses classes de composés, sélectionnées pour leurs activités vis-à-vis de *Plasmodium falciparum* via un test phénotypique, se sont avérés être des inhibiteurs de PfATP4 (Jiménez-Díaz *et al.*, 2014; Lehane *et al.*, 2014; Spillman and Kirk, 2015; Spillman *et al.*, 2013; Vaidya *et al.*, 2014). Ces composés ont pour point commun d'augmenter la concentration en sodium intracellulaire, d'alcaliniser le cytosol et de diminuer l'acidification du cytosol induite suite au blocage de la pompe H⁺-ATPase par la concanamycin A (Lehane *et al.*, 2014). Ces composés présentent également un mode d'action rapide et sont actifs de façon égale vis-à-vis des différents stades de développement du parasite lors du cycle érythrocytaire (Jiménez-Díaz *et al.*, 2014). Ces composés ciblent également le stade gamétoocyte et pourraient ainsi avoir une indication anti-transmission.

Deux de ces composés sont actuellement en phase de développement clinique : la cipargamine (NITD609 ou KAE609), la plus avancée et le composé (+)-SJ733. Chez l'homme, la cipargamine induit une clairance totale de *P. falciparum* en 16 heures et en 30 heures pour *P. vivax* après un traitement de 3 x 10 mg/j. Le temps de clairance parasitaire n'est pas modifié chez les patients infectés par des souches de *P. falciparum* résistantes à l'artémisinine. Les gamétoocytes détectés chez les patients infectés par *P. vivax* ont été rapidement éliminés après traitement (8 heures) tandis qu'aucun gamétoocyte n'a été détecté avant ou après traitement chez les patients infectés par *P. falciparum*. La demi-vie d'élimination du composé était d'environ 21 heures. Ce composé est donc prometteur et permettrait de traiter les accès à *Plasmodium* tout en inhibant sa transmission (White *et al.*, 2014b). (+)-SJ733 est actuellement en essai clinique afin de déterminer la dose efficace pour traiter *Plasmodium* vis-à-vis de volontaires sains infectés par des sporozoïtes de *P. falciparum* par voie intraveineuse (NCT02867059).

iii . Inhibiteurs de la DHODH

Une nouvelle classe de composés ciblant la mitochondrie a été mise au point dont le composé le plus abouti est DSM265. Ce composé cible la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de la pyrimidine et donc de l'ADN. *Plasmodium* ne dispose pas d'enzyme permettant l'import exogène de pyrimidine, la synthèse *de novo* étant sa seule source contrairement aux cellules de mammifères où les deux voies sont possibles (Phillips and Rathod, 2010). Ce composé est actif vis-à-vis des formes asexuées hépatiques et sanguines de *Plasmodium*. Il a prouvé son efficacité en tant que traitement préventif lors d'un essai clinique chez les volontaires sains traités un jour ou sept jours avant l'inoculation de sporozoïtes de *P. falciparum* par voie intraveineuse. Le traitement par 400 mg assurait 100 % de protection quand administré la veille de l'inoculation,

celui administré sept jours avant conférait une protection partielle des sujets traités, qui développaient une infection plus tardive que les sujets placebo (Sulyok *et al.*, 2017).

iv . Inhibiteur de l'absorption de choline

L'albitiazolium (SAR97276) est un inhibiteur de l'absorption de choline, nécessaire au parasite pour la synthèse de phosphatidylcholine, le lipide principal de ses membranes. L'albitiazolium s'accumule dans le parasite jusqu'à 1000 fois et inhibe la croissance parasitaire avec une CI_{50} de 2 nM. Cette molécule permet de guérir la souris infectée avec une DE_{50} de 0,2 mg/kg/j (i.p.), mais son efficacité *per os* est plus faible (ED_{50} = 13 mg/kg/j) suggérant une faible biodisponibilité. Les essais cliniques ont donc été réalisés par voie i.v. ou i.m. pour évaluer l'efficacité et la sécurité d'emploi de l'albitiazolium vis-à-vis de patients présentant un accès simple et/ou compliqué à *P. falciparum* (Biamonte *et al.*, 2013). Cependant, les deux essais cliniques répertoriées sur le site *clinicaltrials.gov* ont été suspendus, l'un pour cause d'efficacité insuffisante (NCT00739206) et le second sur recommandation du comité de monitoring, sans que la raison ne soit évoquée (NCT01445938).

En conclusion, une dizaine de nouvelles molécules prometteuses sont actuellement en phase clinique et permettent d'éliminer les parasites multi-résistants avec une action rapide et prolongée. De plus, certaines ciblent les stades hépatiques et gamétocytes ce qui permet d'envisager un usage en prophylaxie et/ou pour limiter la transmission. Cependant, il est important de continuer le développement de nouvelles classes de composés antipaludiques étant donné que ces composés ne sont pas encore sur le marché et que le développement de combinaisons ne comprenant que des médicaments présentant un mécanisme d'action nouveau et des propriétés pharmacocinétiques proches pourraient limiter le développement de résistances à ces nouvelles classes.

C . Flavonoïdes et flavones

La famille chimique qui fait l'objet de ce travail est celle des flavonoïdes, à laquelle aucun antipaludique sur le marché ou en développement n'appartient à notre connaissance. Néanmoins, c'est une famille chimique qui a été explorée pour ses propriétés antipaludiques. Cette partie présente l'état actuel des connaissances dans le domaine et fait l'objet d'un article en préparation pour la revue *Natural Product Reports* intitulé "*Antiplasmodial activities of naturally occurring flavonoids and their derivatives*" par F. Nardella, E. Candolfi et C. Vonthron-Sénécheau.

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux et servent à attirer les pollinisateurs et à protéger les tissus des effets nocifs du rayonnement ultraviolet B. Ils peuvent également jouer un rôle protecteur vis-à-vis des microorganismes (*i.e.* isoflavanes antifongiques) ou des animaux phytophages (*i.e.* tannins). Tous les flavonoïdes *stricto sensu* ont une origine biosynthétique commune et possèdent ainsi une structure de base à savoir le noyau 2-phénylchromane

(3-phénylchromane pour les isoflavonoïdes). Ils sont regroupés en différentes classes en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central et de la nature du substituant en position 3 (**Figure 25**) (Bruneton, 2009). Quatre types majeurs de substituants peuvent être retrouvés: hydroxyle, méthoxyle, prényle et osidique. Malgré la faible diversité apparente de ces substituants, plus de 8000 composés différents ont déjà été décrits (Gil and Cout, 2013).

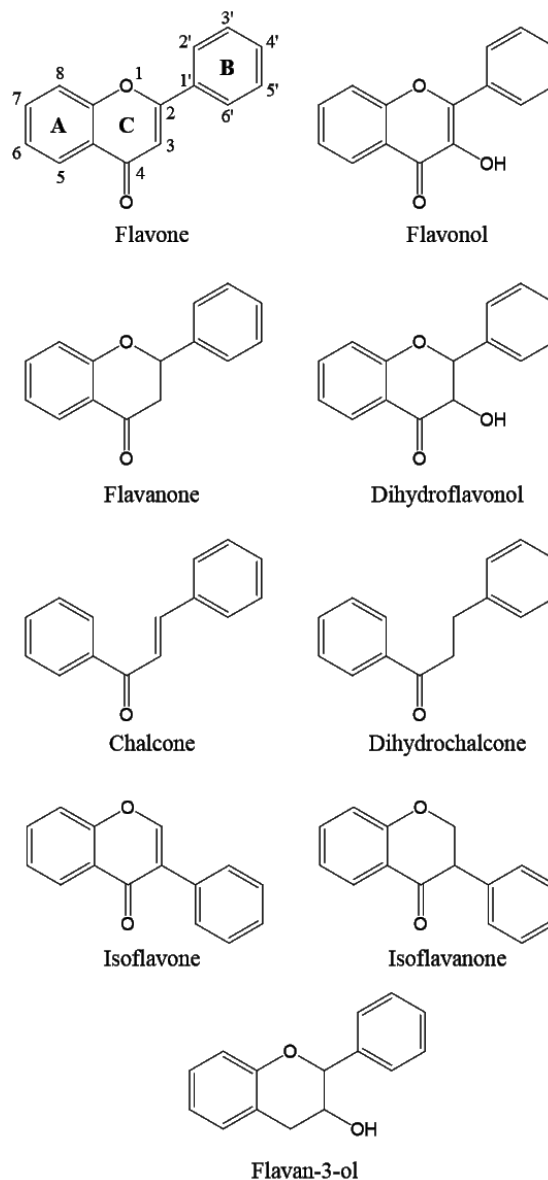


Figure 25. Structure des flavonoïdes. Afin de faciliter la lecture du manuscrit, ces structures sont rappelées dans le rabat en quatrième de couverture

1. Etude bibliographique des flavonoïdes présentant une activité antipaludique

De nombreux flavonoïdes ont été décrits comme présentant une activité anti-*Plasmodium in vitro* (environ 270 molécules), cependant ce nombre est faible comparé aux 8000 structures décrites dans cette famille. De plus, seuls 28 composés présentent une activité antipaludique marquée ($CI_{50} \leq 1 \mu M$),

soit environ 1/10^{ème} des composés décrits (Abdalla and Laatsch, 2012; Auffret *et al.*, 2007; Bringmann *et al.*, 2000; Helgren *et al.*, 2015; Ichino *et al.*, 2006; Konziase, 2015; Nunome *et al.*, 2004; Ramanandraibe *et al.*, 2008; Weniger *et al.*, 2006; Widyawaruyanti *et al.*, 2007; Zakaria *et al.*, 2012). Parmi ces 28 composés, 12 sont substitués en position 8 et/ou 14 en position 3 (sans compter les liaisons entre les sous-unités des biflavonoïdes), suggérant l'importance de ces positions dans l'activité. Les composés les plus actifs sont essentiellement des biflavonoïdes et des flavonoïdes prénylés ou synthétiques. Environ la moitié des composés décrits sont d'origine naturelle : 13 (**Figure 26**) contre 15 d'origine synthétique ou hémisynthétique (**Figure 27**).

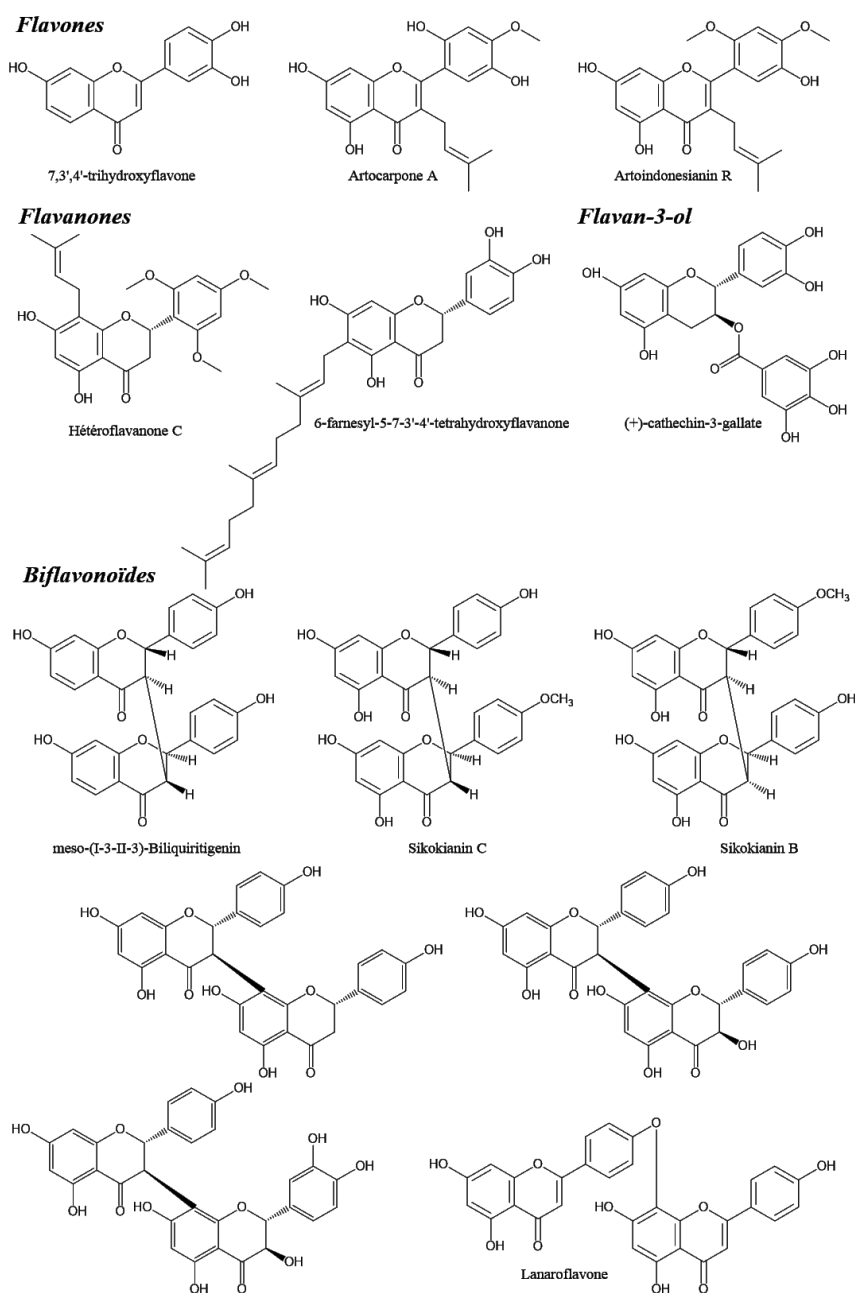


Figure 26. Flavonoïdes naturels décrits dans la littérature et présentant une $CI_{50} \leq 1 \mu M$ vis-à-vis de *Plasmodium* (Abdalla and Laatsch, 2012; Ichino *et al.*, 2006; Konziase, 2015; Nunome *et al.*, 2004; Ramanandraibe *et al.*, 2008; Weniger *et al.*, 2006; Widyawaruyanti *et al.*, 2007; Zakaria *et al.*, 2012)

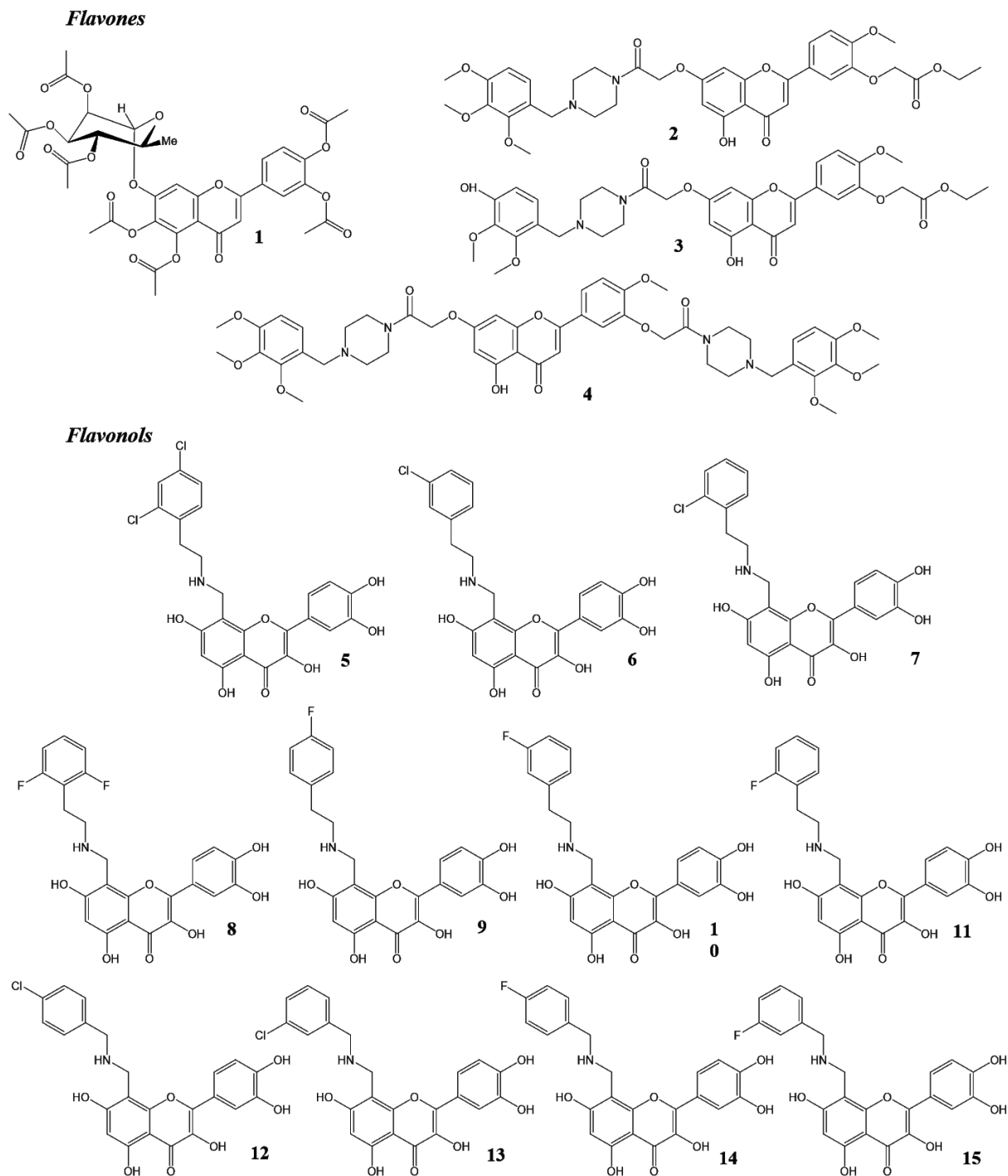


Figure 27. Flavonoïdes synthétiques ou hémisynthétiques décrits dans la littérature et présentant une $CI_{50} \leq 1 \mu M$ vis-à-vis de *Plasmodium* (Auffret *et al.*, 2007; Bringmann *et al.*, 2000; Helgren *et al.*, 2015)

i. Activité antipaludique en fonction de la classe de flavonoïde

Les activités antipaludiques et cytotoxiques ont été regroupées par classe de flavonoïde dans la **Figure 28**, toutes souches et tous tests confondus. L'activité antipaludique a été différenciée en fonction de l'origine naturelle ou synthétique des composés.

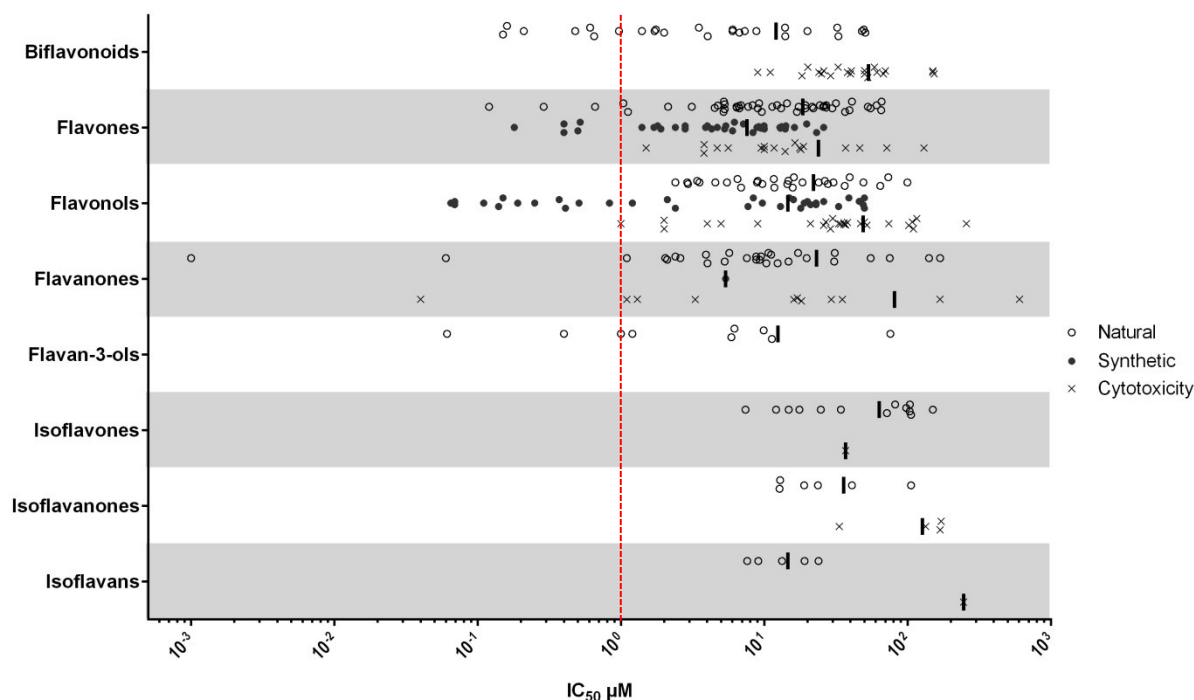


Figure 28. Activités antipaludique et cytotoxique *in vitro* des différents flavonoïdes en fonction de leur classe et de leur origine (naturelle vs synthétique/hémisynthétique), toutes souches et tous tests confondus. Lorsque le composé a été décrit plusieurs fois, seule la plus petite valeur de CI_{50} a été représentée pour les activités antipaludique et cytotoxique. Le trait plein représente la médiane des valeurs de chaque classe, le trait rouge en pointillé représente la valeur seuil de CI_{50} de 1 μM . ○ activité antipaludique des flavonoïdes naturels ; ● activité antipaludique des flavonoïdes synthétiques ; x activité cytotoxique des flavonoïdes de toutes origines. **Biflavonoïdes** (Ahmed *et al.*, 2001; Azebaze *et al.*, 2007, 2015; Chukwujekwu *et al.*, 2012; Dhooghe *et al.*, 2010; Ichino *et al.*, 2006; Konziase, 2015; Mbwambo *et al.*, 2006; Nunome *et al.*, 2004; Weniger *et al.*, 2006) ; **Flavones** (Abdalla and Laatsch, 2012; Atay *et al.*, 2016; Auffret *et al.*, 2007; van Baren *et al.*, 2006; Bourjot *et al.*, 2010; Bringmann *et al.*, 2000; Gadetskaya *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2010; Ijaz *et al.*, 2010; Juma *et al.*, 2011; Kant *et al.*, 2016; Kerubo *et al.*, 2013; Kraft *et al.*, 2003; Montenegro *et al.*, 2007; Rukachaisirikul *et al.*, 2008; Surat Boonphong *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2006; Widyawaruyanti *et al.*, 2007) ; **Flavonols** (Adams *et al.*, 2009; Adelekan *et al.*, 2008; Casano *et al.*, 2010; Ganesh *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2010; Helgren *et al.*, 2015; Houël *et al.*, 2016; Kraft *et al.*, 2003; Monbrison *et al.*, 2006; Ortet *et al.*, 2011; del Rayo Camacho *et al.*, 2002; Subeki *et al.*, 2005; Tasdemir *et al.*, 2006; Torres-Mendoza *et al.*, 2006) ; **Flavanones** (Adelekan *et al.*, 2008; van Baren *et al.*, 2006; Frölich *et al.*, 2005; Ganesh *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2010; Kanokmedhakul *et al.*, 2004; Kerubo *et al.*, 2013; Khaomek *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2004; Lenta *et al.*, 2009; Portet *et al.*, 2007; Rukachaisirikul *et al.*, 2008; Soon Sung Lim *et al.*, 2007; Surat Boonphong *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2006; Widyawaruyanti *et al.*, 2007; Yenesew *et al.*, 2012; Zakaria *et al.*, 2012) ; **Flavan-3-ols** (Helgren *et al.*, 2015; Ramanandraibe *et al.*, 2008; Tasdemir *et al.*, 2006) ; **Isoflavones** (Andayi *et al.*, 2006; Khaomek *et al.*, 2008; Kraft *et al.*, 2000; Ngamga *et al.*, 2005; Songsiang *et al.*, 2009; Tasdemir *et al.*, 2006) ; **Isoflavanones** (Dhooghe *et al.*, 2010; Upegui *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009) ; **Isoflavanes** (Cheema *et al.*, 2014; Yenesew *et al.*, 2012)

Nous pouvons conclure de cette analyse graphique que les isoflavonoïdes sont peu actifs, même s'ils sont moins représentés que les autres classes. Aucun composé synthétique n'a été décrit pour ces les trois classes d'isoflavonoïdes (isoflavone, isoflavanones, isoflavanes). Lorsque l'on compare les médianes des composés naturels, les biflavonoïdes et les flavanols sont les classes les plus actives, les premiers ayant un indice de sélectivité intéressant (valeurs non décrites pour les flavanes). Les flavones, flavonols et flavanones présentent des activités similaires, certains composés présentant des activités submicromolaires dans la classe des flavones et flavanones. Les flavonols naturels ne semblent pas permettre d'atteindre des activités submicromolaires, du moins pour les composés décrits. Concernant les composés synthétiques, seules deux classes sont réellement représentées : les flavones et flavonols. Ces composés sont tous des composés azotés qui émanent de trois études

différentes (**Figure 27**) (Auffret *et al.*, 2007; Casano *et al.*, 2010; Helgren *et al.*, 2015). En 2007, Auffret et ses collègues ont décrit la synthèse d'une série de flavones présentant une piperazine substituée en position 7 et/ou 3'. L'activité la plus importante qu'ils ont obtenue *in vitro* était de 180 nM sur la souche D6 de *P. falciparum*. Ils ont obtenu deux composés partiellement actifs *in vivo* en suivant le modèle des 4 jours de Peter (*P. yoelii nigeriensis* N67, 50 et 10 mg/kg *per os*) présentant des pourcentages d'inhibition de 38,5 à 43,1 % à J4, à une dose de 50 mg/kg (Auffret *et al.*, 2007). Casano *et al.* ont décrit une série de flavonols substitués par un amide ou une amine primaire en position 6 pour lesquels ils ont fait varier les substituants sur le cycle B. Ils ont obtenu des composés peu actifs (meilleure activité : 7,7 μ M, *P. falciparum* W2) et pour un certain nombre, non sélectifs (Casano *et al.*, 2010). Nous allons plus particulièrement nous intéresser à l'étude de Helgren et ses collègues étant donné qu'ils ont synthétisé des analogues de la quercétine substitués en position 8, position d'intérêt dans notre série chimique. Ils ont conservé les hydroxyles de la quercétine en positions 3, 5, 7, 3' et 4' et ont fait varier les substituants en position 8. Leur but était d'augmenter la solubilité de la quercétine en introduisant un substituant azoté et pour lequel il est possible d'obtenir un sel. Les composés les plus actifs ont une activité d'environ 70 nM et présentent une activité conservée sur les 3 types de souches évaluées (D6 : chloroquino-sensible, méfloquino-résistante ; W2 : chloroquino-résistante, méfloquino-sensible ; C235 : chloroquino-, méfloquino- et pyriméthamine-résistante) mais la cytotoxicité et l'activité *in vivo* de ces composés n'est pas précisée. Il ressort de la RSA qu'augmenter la longueur de la chaîne carbonée en position 8 augmente l'activité antipaludique (dérivés phényl (5-11) vs benzyl amine (12-15), **Figure 27**) et que la présence d'halogène est indispensable à l'activité. Les composés oxygénés (dérivés furfurylamine) et les amines tertiaires (pipérazine/pipéridine, non représentés) sont peu actifs mais ils sont également non halogénés, il est donc difficile de conclure si la perte d'activité est due à la présence d'une amine tertiaire ou à l'absence d'halogène (Helgren *et al.*, 2015). Comme nous le verrons par la suite, ces composés sont assez différents de ceux que nous proposons dans ce travail, notamment par le fait que la quercétine est polyhydroxylée. Une étude de 1972 a montré que les flavonoïdes polyhydroxylés subissaient une ouverture du noyau chromène quand administrés chez le rat par voie orale (Griffiths and Smith, 1972).

Il semblerait que cette ouverture du cycle soit due à la microflore intestinale, sachant que les rats traités par l'antibiotique Néomycine avant administration du flavonoïde ne présentaient plus ce type de métabolites. Certaines caractéristiques structurales semblaient diminuer la susceptibilité à l'ouverture du cycle B : l'absence d'un hydroxyle libre en position 5 (la présence d'un méthoxyle en position 5 annule l'ouverture du cycle) ou l'absence d'un hydroxyle libre en position 4' (**Figure 29**). Par conséquent, les composés décrits par Helgren et collègues, même si très actifs *in vitro*, auraient vraisemblablement subi une ouverture du cycle B quand administrés *in vivo* *per os* et auraient donc potentiellement perdu toute ou partie de leur activité.

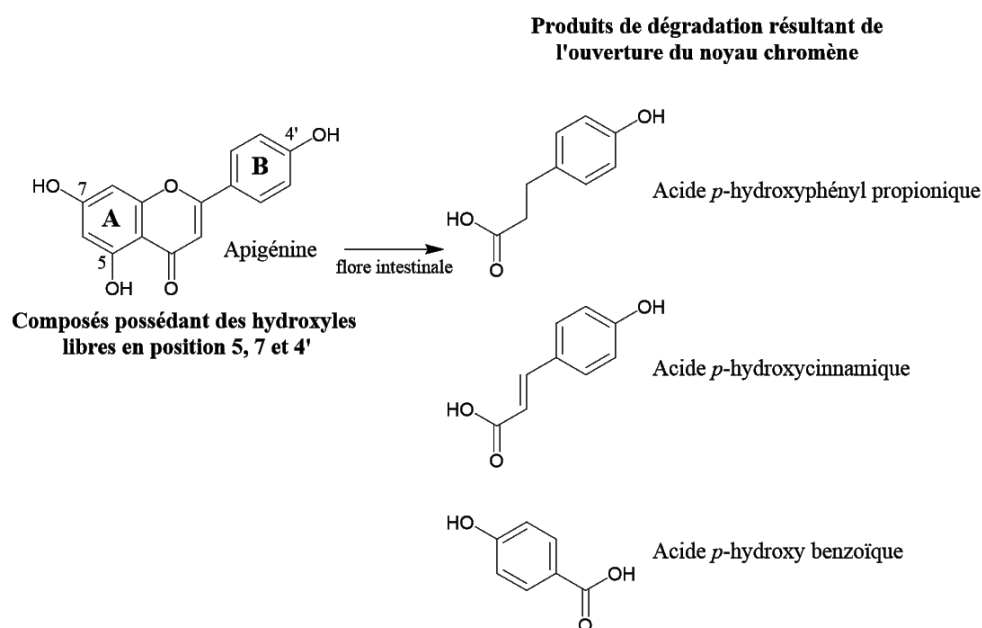


Figure 29. Ouverture du noyau chromène des flavonoïdes présentant des hydroxyles libres en position 5 et 7 du cycle A et 4' du cycle B d'après les données de Griffiths and Smith, 1972

ii. Activité antipaludique des flavones et flavonols en fonction du type de substituant

Un focus sur les flavones et flavonols est présenté ci-dessous, en fonction de la nature des substituants en présence, les composés faisant l'objet de cette étude appartenant à la classe des flavones substitués.

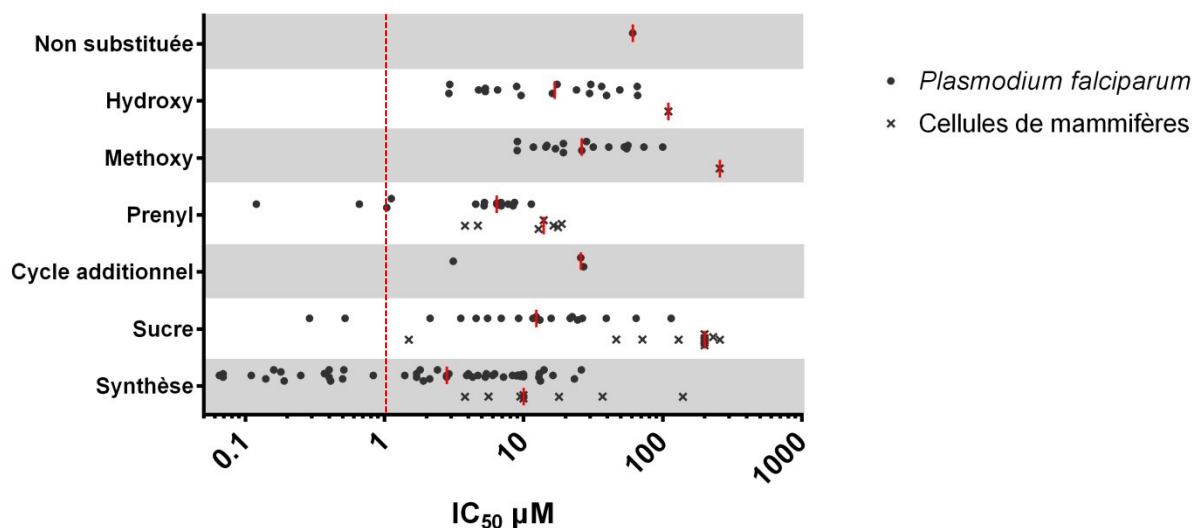


Figure 30. Activités antipaludique et cytotoxique *in vitro* des flavones et flavonols en fonction du type de substituants présents. Lorsque le composé a été décrit plusieurs fois, seule la plus petite valeur de CI_{50} a été représentée pour les activités antipaludique et cytotoxique. Le trait rouge plein représente la médiane des valeurs de chaque classe, le trait rouge en pointillé représente la valeur seuil de CI_{50} de 1 μM . ● activité antipaludique vis-à-vis de *P. falciparum* (tous tests et toutes souches confondus) ; x activité cytotoxique vis-à-vis de différentes lignées cellulaires de mammifères. Les composés d'origine synthétique sont regroupés dans la catégorie « synthèse » en bas de la figure.

Les activités antipaludiques et cytotoxiques des flavones et flavonols ont été regroupées dans la **Figure 30** en fonction du type de substitutions présentes. L'activité du noyau flavone nu (non substitué) a été représentée en comparaison. Les composés ont été classés dans la catégorie « hydroxy » quand ils ne présentaient qu'un ou des groupement(s) hydroxyle(s), dans la catégorie « methoxy » quand ils présentaient au moins une substitution méthoxyle, dans la catégorie « prényl » quand ils comprenaient au moins une substitution par un prényle ou farnésyle, dans la catégorie « cycle additionnel » quand ils comprenaient un cycle en plus du noyau flavone et dans la catégorie « sucre » quand ils présentaient un groupement osidique. Lorsque les composés présentaient un groupement prényle en plus d'un sucre ils ont été classés dans la catégorie « prényl » et lorsqu'ils comprenaient un cycle additionnel en plus d'un sucre ils ont été classés dans la catégorie « sucre ». Les composés synthétiques et hémisynthétiques ont été regroupés dans la catégorie « synthèse ». Là encore lorsque l'activité antipaludique et/ou cytotoxique du composé a été décrite plusieurs fois, seule la plus petite valeur de CI_{50} a été retenue.

Il ressort clairement de cette analyse graphique que les activités les plus importantes sont obtenues lorsque les composés sont prénylés, substitués par un sucre ou bien d'origine synthétique. Concernant la catégorie « sucre », certains des composés (les plus actifs de la catégorie) présentaient des hydroxyles polysubstitués par des groupements acétyle ou gallate, qui tendaient à réduire la polarité et ainsi augmenter l'activité.

iii . Influence de la position et de la nature de la substitution des flavones et flavonols

Les composés ont ensuite été classés en fonction de la polarité de la substitution pour chaque position et ont été regroupés dans les catégories « non substitué » quand la position en question ne présentait pas de substituant, « polaire » quand la position en question comprenait une substitution par un hydroxyle ou un sucre et « apolaire » quand la position était substituée par un groupement méthoxyle, prényle/farnésyle, était impliquée dans un cycle additionnel ou était substituée par un sucre acétylé. Les composés synthétiques n'ont pas été inclus dans cette représentation.

La **Figure 31** représente l'activité antipaludique des flavones et flavonols en fonction de la nature et de la position du substituant. D'après ces données, les composés semblent plus actifs quand ils sont substitués par un groupement polaire en position 5, 7, 3', 4', 5' ou 6' ou par un groupement apolaire en position 3, 6 et 2'. Concernant la position 8, la non-substitution ou la substitution par un groupement apolaire induit un effet équivalent. Cependant, cette représentation est à pondérer par le fait que le nombre de composés n'a pas pu être représenté pour des raisons de clarté. Nous avons donc réalisé une étude statistique d'association de l'activité à la nature de la substitution par le calcul des Odds-Ratio (OR) (Szumilas, 2010), qui tient compte des effectifs et dont les données sont représentées dans le **Tableau 2**.

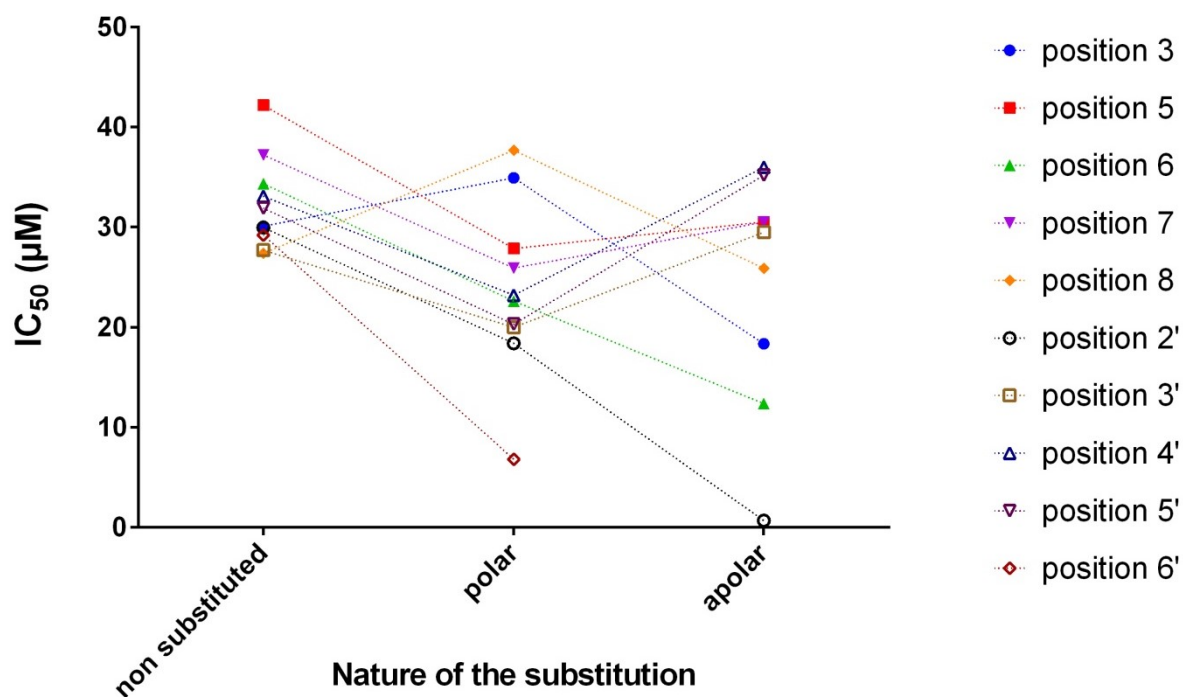


Figure 31. Activité antipaludique *in vitro* des flavones et flavonols naturels en fonction de la nature de la substitution. Non substitué, polaire (hydroxyle/oside), apolaire (méthoxyle, prényle, cycle additionnel, sucre acétylé)

Tableau 2. Analyse de l'association du facteur activité ($CI_{50} \leq 10$) au facteur "type de substitution" pour les flavones et flavonols. Un odd-ratio (OR) supérieur à 1 indique un effet favorable à l'activité du type de substitution considéré. Un odd-ratio inférieur à 1 indique un effet défavorable à l'activité. L'intervalle de confiance de l'OR est indiqué, ainsi que le degré de significativité. Les OR significatifs d'un point de vue statistique ($p > 0,05$) sont surlignés en vert. Les OR n'ont pas été calculés pour les groupes oui/non où l'effectif était inférieur ou égal à 5. Les composés ont été classés en fonction de leur activité (actifs = $CI_{50} \leq 10 \mu M$, non actifs $CI_{50} > 10 \mu M$) et de la nature de la substitution : non substitué, polaire (hydroxyle/oside), apolaire (méthoxyle, prényle, cycle additionnel, sucre acétylé), encombrement (prényle/farnésyle, cycle additionnel, sucre). Les règles de Lipinsky ont également été prises en compte : Hbond D = donneur de liaison hydrogène, Hbond A = accepteur de liaison hydrogène, MW = masse molaire, LogP = coefficient de partage octanol/eau prédit avec le logiciel Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/services/logp.html>).

Position et nature de la substitution	OUI				NON				OR	IC95%	p	Conclusion
	total	actifs	non actifs	%	total	actifs	non actifs	%				
3, polaire	28	4	24	14,3	54	17	37	31,5	0.3669	[0.08 ; 1.3153]	0.1137	
3, apolaire	19	11	8	57,9	63	10	53	15,9	7.0563	[2.0284 ; 26.353]	0.000598	favorable
3, non substitué	35	6	29	17,1	47	15	32	31,9	0.4457	[0.1243 ; 1.4201]	0.2004	
5, polaire	53	16	37	30,2	29	5	24	17,2	2.0582	[0.6132 ; 8.1506]	0.2905	
5, apolaire	10	2	8	20,0	72	19	53	26,4	0.7002	[0.0667 ; 3.9653]	1	
5, non substitué	19	3	16	15,8	63	18	45	28,6	0.4727	[0.0788 ; 1.9551]	0.3726	
6, polaire	9	3	6	33,3	73	18	55	24,7	1.5193	[0.2232 ; 8.0329]	0.6873	
6, apolaire	14	8	6	57,1	68	13	55	19,1	5.4893	[1.4012 ; 22.9997]	0.00602	favorable
6, non substitué	59	10	49	16,9	23	11	12	47,8	0.2276	[0.0675 ; 0.7389]	0.0095	défavorable
7, polaire	40	9	31	22,5	42	12	30	28,6	0.7287	[0.2336 ; 2.2032]	0.6164	
7, apolaire	36	12	24	33,3	46	9	37	19,6	2.0371	[0.6707 ; 6.4085]	0.2043	
7, non substitué	6	0	6	0,0	76	21	55	27,6				
8, polaire	2	0	2	0,0	80	21	59	26,3				
8, apolaire	18	4	14	22,2	64	17	47	26,6	0.7921	[0.1666 ; 3.0169]	1	
8, non substitué	62	17	45	27,4	20	4	16	20,0	1.5039	[0.4028 ; 7.0641]	0.5720	

Position et nature de la substitution	OUI				NON				OR	IC95%	p	Conclusion
	total	actifs	non actifs	%	total	actifs	non actifs	%				
2', polaire	8	6	2	75,0	74	15	59	20,3	11.3326	[1.8017 ; 125.8298]	0.00299	favorable
2', apolaire	1	1	0	100,0	81	20	61	24,7				
2', non substitué	73	14	59	19,2	9	7	2	77,8	0.0709	[0.0065 ; 0.4241]	0.000769	défavorable
3', polaire	6	1	5	16,7	76	20	56	26,3	0.5635	[0.0113 ; 5.4945]	1	
3', apolaire	10	2	8	20,0	72	19	53	26,4	0.7002	[0.0667 ; 3.9653]	1	
3', non substitué	66	18	48	27,3	16	3	13	18,8	1.6161	[0.3787 ; 9.8667]	0.7501	
4', polaire	39	14	25	35,9	43	7	36	16,3	2.8422	[0.9158 ; 9.6025]	0.04780	favorable
4', apolaire	23	6	17	26,1	59	15	44	25,4	1.0348	[0.281 ; 3.4423]	1	
4', non substitué	20	1	19	5,0	62	20	42	32,3	0.1126	[0.0025 ; 0.8122]	0.01731	défavorable
5', polaire	26	11	15	42,3	56	10	46	17,9	3.3169	[1.0507 ; 10.7598]	0.02865	favorable
5', apolaire	12	1	11	8,3	70	20	50	28,6	0.2303	[0.005 ; 1.7829]	0.1731	
5', non substitué	44	9	35	20,5	38	12	26	31,6	0.5612	[0.1792 ; 1.6997]	0.3132	
6', polaire	1	1	0	100,0	81	20	61	24,7				
6', apolaire	1	1	0	100,0	81	20	61	24,7				
6', non substitué	80	19	61	23,8	2	2	0	100,0				
3, encombrement	20	10	10	50,0	62	11	51	17,7	4.5311	[1.3438 ; 15.7915]	0.00726	favorable
5, encombrement	3	0	3	0,0	79	21	58	26,6				
6, encombrement	12	6	6	50,0	70	15	55	21,4	3.5964	[0.8318 ; 15.722]	0.06716	favorable
7, encombrement	16	7	9	43,8	66	14	52	21,2	2.8456	[0.7583 ; 10.4668]	0.1066	
8, encombrement	14	4	10	28,6	68	17	51	25,0	1.1972	[0.2422 ; 4.8778]	0.7470	
2', encombrement	0	0	0		82	21	61	25,6				
3', encombrement	2	1	1	50,0	80	20	60	25,0				
4', encombrement	3	1	2	33,3	79	20	59	25,3				
5', encombrement	1	0	1	0,0	81	21	60	25,9				
6', encombrement	1	1	0	100,0	81	20	61	24,7				
Hbond D < 5	63	18	45	28,6	19	3	16	15,8	2.1157	[0.5115 ; 12.6892]	0.3726	
Hbond A < 10	66	18	48	27,3	16	3	13	18,8	1.6161	[0.3787 ; 9.8667]	0.7501	
MW < 500 Da	72	17	55	23,6	10	4	6	40,0	0.4686	[0.0973 ; 2.5295]	0.2694	
LogP < 5	76	15	61	19,7	6	6	0	100,0				

D'après les résultats obtenus, nous pouvons en conclure que la présence d'un substituant polaire en position 2', 4' ou 5' ou d'un substituant apolaire en position 3 ou 6 est favorable à l'activité. Il en est de même quand les positions 3 et 6 sont encombrées. En revanche, lorsque les positions 6, 2' et 4' sont non substituées, cela est défavorable à l'activité. Les règles de Lipinski ne jouent pas de rôle prépondérant dans ce cas, les OR n'étant pas significativement différent de 1. Cependant, même si ces données nous donnent une idée plus claire de la relation structure-activité des flavones et flavonols naturels, elles sont tout de même à considérer avec précaution étant donné que chaque position est traitée individuellement. Pour pouvoir obtenir des données réellement fiables, il faudrait réaliser une étude multivariée qui tient compte de l'influence des autres positions substituées et de cofacteurs

pouvant éventuellement interférer comme la solubilité ou les règles de Lipinsky, mais qui dépasse malheureusement nos compétences.

iv . Activité antipaludique des flavones et flavonols en fonction du statut de résistance des souches de *P. falciparum*

Le ratio des CI_{50} décrites pour les souches résistantes (FcB1, K1, W2, FCR-3, Dd2, C235) sur celles décrites pour les souches sensibles à la chloroquine (3D7, NF54, PoW, D6) a été calculé pour les composés ayant été évalués sur plusieurs types de souches. Ces ratios ainsi que la médiane des valeurs ont été représentés sur la **Figure 32**.

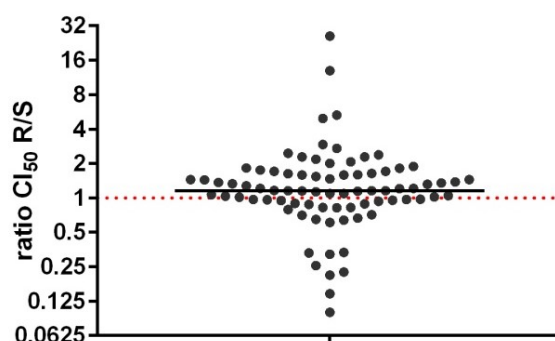


Figure 32. Ratios des CI_{50} décrites dans la littérature sur des souches résistantes (R ; FcB1, K1, W2, FCR-3, Dd2, C235) sur celles décrites sur les souches sensibles à la chloroquine (S ; 3D7, NF54, PoW, D6) pour les flavones et flavonols. Le trait noir plein représente la médiane des valeurs, le trait rouge pointillé représente la valeur 1 qui représente une activité équivalente vis-à-vis des souches sensibles et résistantes.

La médiane des ratios a une valeur approximativement égale à 1 et est très légèrement en faveur d'une efficacité plus importante sur souches sensibles. Cependant environ la moitié des composés sont plus efficaces sur les souches sensibles (ratio > 1) et inversement (ratio < 1). L'efficacité sur les souches sensibles ou résistantes dépend donc du composé évalué et ne peut pas être généralisée à une classe.

2 . Mécanismes d'action et propriétés des flavonoïdes décrits vis-à-vis des protozoaires

De nombreuses voies métaboliques ont été décrites dans la littérature concernant l'action des flavonoïdes vis-à-vis des protozoaires, dont *Plasmodium*. Les mécanismes mis en jeu ciblent la voie de biosynthèse des acides gras, les mécanismes redox, la mitochondrie, la digestion de l'hémoglobine, les effets sur l'osmolarité due aux *New Permeability Pathways* (NPP) et la division parasitaire. De plus, l'action des flavonoïdes a également été mise en évidence *in vivo* avec une diminution de l'infection hépatique et de la splénomégalie chez les animaux traités.

i . Voies métaboliques de l'apicoplaste

L'apicoplaste est une cible privilégiée chez les Apicomplexes car c'est un chloroplaste relictuel d'origine algale qui a perdu ses fonctions photosynthétiques, mais qui présente plusieurs voies métaboliques dont les fonctions sont proches de celles rencontrées chez les végétaux et qui sont

indispensables à la survie du parasite. Les enzymes de ces voies métaboliques sont donc des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux médicaments car elles ne sont pas présentes dans les cellules animales et permettraient donc de s'assurer d'une certaine sélectivité (Lim and McFadden, 2010).

a . Voie de biosynthèse des acides gras

La voie de synthèse des acides gras (FAS-II) a longtemps été considérée comme essentielle à la survie intra-érythrocytaire du parasite notamment car le Triclosan, inhibiteur de l'enzyme FabI bactérienne appartenant à cette voie (énoyl-ACP-réductase), s'est révélé actif vis-à-vis de *Plasmodium* (Beeson *et al.*, 2001). Cependant, il semblerait que le Triclosan, qui cible effectivement l'enzyme FabI chez les bactéries, n'ait pas la même cible chez *Plasmodium* – ou du moins pas cette cible unique, cette enzyme n'étant pas essentielle pour la survie du parasite lors de la schizogonie érythrocytaire (Shears *et al.*, 2015). En revanche, le complexe FAS-II semble essentiel à la survie du parasite lors de la schizogonie hépatique et lors de la différenciation des sporozoïtes chez le moustique (Lim and McFadden, 2010; van Schaijk *et al.*, 2014). De plus, il a été montré que cette voie est surexprimée chez les parasites résistants à l'artémisinine lors du phénomène de dormance induite par l'artémisinine et représente donc une cible pour diminuer le taux de recrudescence après un traitement par CTA (Chen *et al.*, 2014). Cette voie métabolique implique une série d'enzymes notamment la β -acétoacyle-ACP-réductase (FabG), la β -hydroxyacyle-ACP-déshydratase (FabZ) et l'énoyl-ACP-réductase (FabI) (**Figure 33**).

Tasdemir *et al.* ont évalué l'activité d'une série de flavonoïdes naturels vis-à-vis de ces enzymes. Les flavones ou flavonols polyhydroxylés et notamment sur le cycle B permettent l'inhibition de trois de ces enzymes avec des valeurs de CI_{50} comprises entre 0,4 et 14 μ M. La méthylation d'un seul des groupements hydroxyles suffit à annuler l'effet observé. En revanche, les flavanones et isoflavones testées n'ont pas démontré d'activité intéressante suggérant l'importance du noyau flavone et de sa configuration planaire. Au contraire, le noyau catéchine estérifié par un acide gallique en différentes positions présentait des activités intéressantes (CI_{50} 0,2 – 1,1 μ M), effet totalement perdu en absence d'estérification (**Figure 34**) (Tasdemir *et al.*, 2006). Muhammad *et al.* ont également évalué l'activité de flavonoïdes vis-à-vis de la *Plasmodium* énoyl-ACP-reductase (FabI) mais n'ont obtenu de résultats concluants que pour un composé — la méthylènebissantine, biflavonoïde présentant une liaison interflavonyl méthylène entre les positions 8 et 8'' — dont l'activité s'avère très moyenne (91,13 μ M). L'activité de ce composé sur des cultures de *Plasmodium* n'a pas été rapportée (Muhammad *et al.*, 2012).

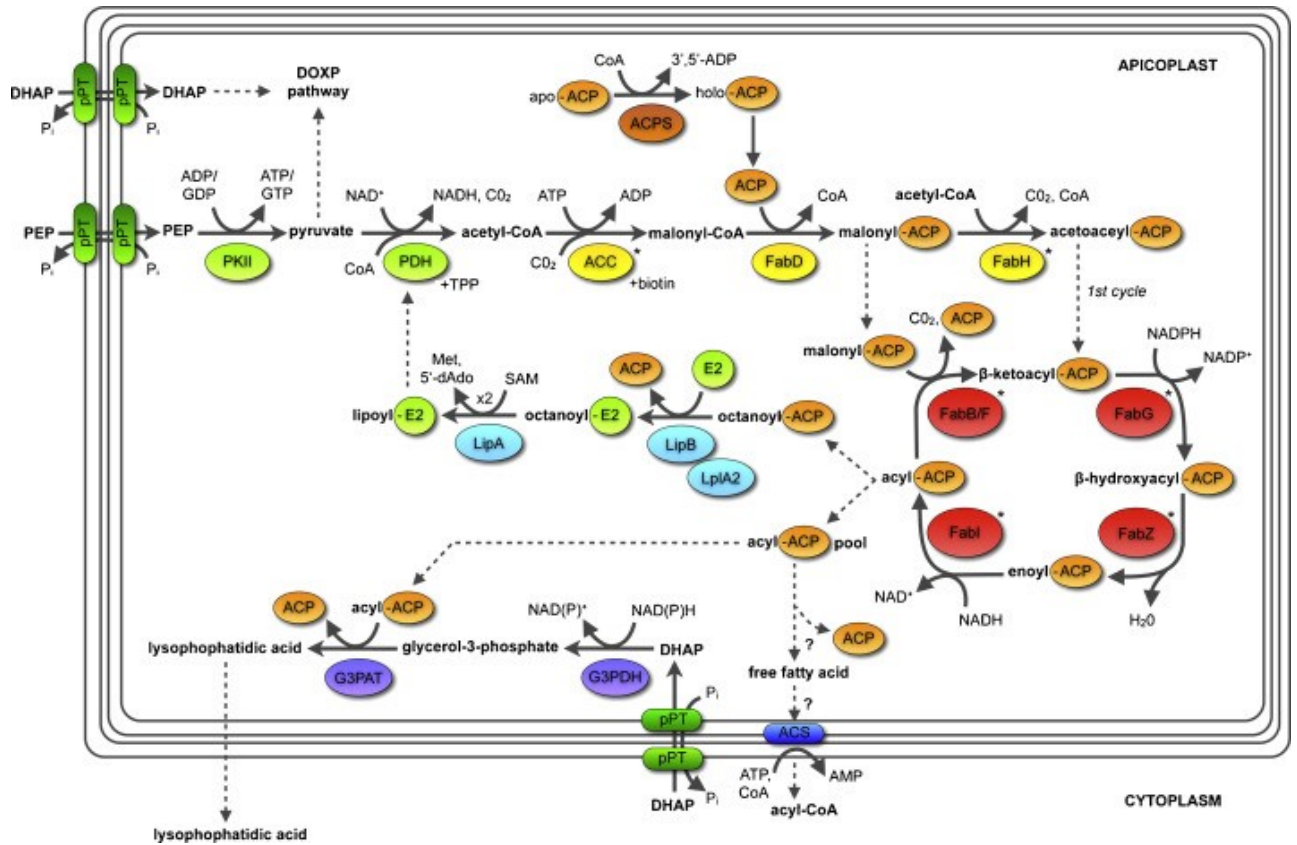


Figure 33. Voie de biosynthèse des acides gras au sein de l'apicoplaste de *Plasmodium*. En rouge sont représentées les enzymes employées par Tasdemir *et al.*, 2006 pour évaluer l'activité de flavonoïdes. D'après Shears *et al.*, 2015.

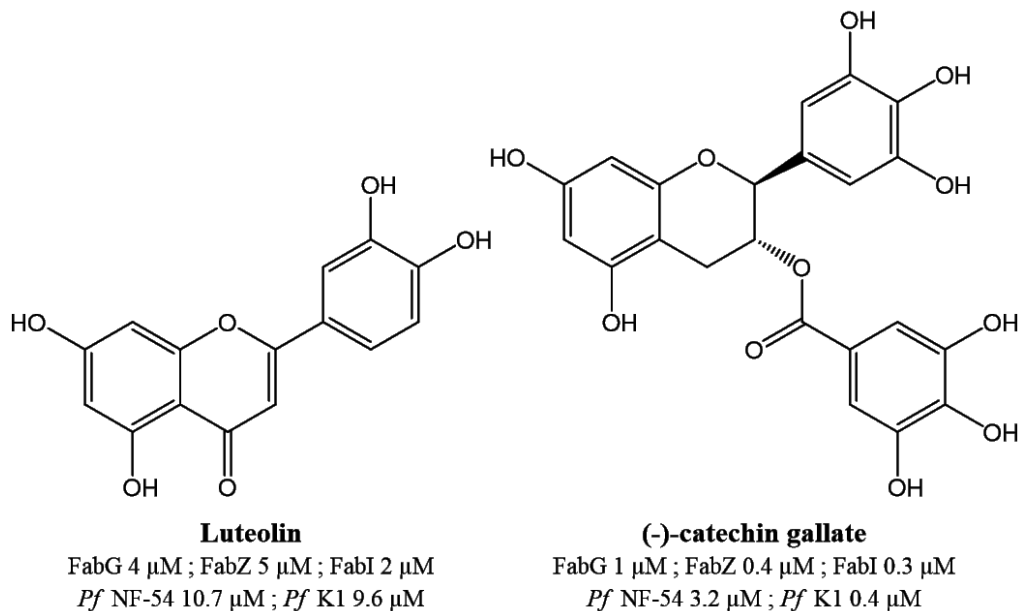
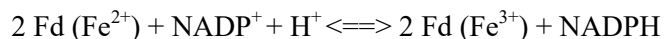


Figure 34. Composés les plus actifs décrits par Tasdemir *et al.* vis-à-vis des enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras de *Plasmodium*. Les activités indiquées correspondent aux CI₅₀ vis-à-vis des enzymes (Fabs) ou des stades sanguins de *P. falciparum* (Pf) (Tasdemir *et al.*, 2006).

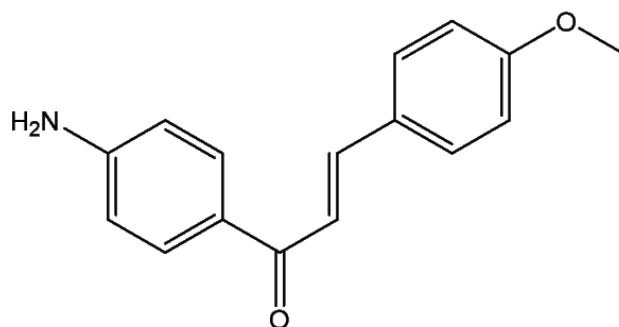
b . Inhibition de la ferredoxin-NADP⁺ reductase

La ferredoxin-NADP⁺ reductase (*PfFNR*) est une enzyme d'origine végétale impliquée dans la photosynthèse et présente dans l'apicoplaste de *Plasmodium*. Elle contribue à l'équilibre redox des voies métaboliques de l'apicoplaste (Seeber *et al.*, 2005) et catalyse la réaction suivante :



Bien que cette réaction se déroule dans le sens de la formation de NADPH chez la plante, il semblerait que la réaction soit inversée chez les Apicomplexes (Seeber *et al.*, 2005).

Suwito *et al.* se sont basés sur les interactions entre les acides aminés acides de la ferredoxine (Fd) avec les acides aminés basiques de la *PfFNR* (Kimata-Arigo *et al.*, 2007) et sur l'importance des groupements méthoxyles dans l'activité antipaludique de chalcones synthétiques (Liu *et al.*, 2001) pour le design de leur série de méthoxyaminochalcones. L'amine introduite sur le cycle A est sensée former une interaction électrostatique avec les acides aminés acides de la ferredoxine pour empêcher l'interaction électrostatique ferredoxine-*PfFNR*. Pour éprouver cette hypothèse, ils ont également synthétisé des dérivés bromés, étant donné qu'un brome greffé sur un cycle aromatique est connu pour avoir un effet électroattracteur, tandis que l'amine a un effet donneur. Certains de leurs composés sont capables d'inhiber l'enzyme *PfFNR* de 5 à 50 % à 100 μM et ils ont pu en tirer les conclusions suivantes : les chalcones aminées présentaient une meilleure activité que les chalcones bromées ou avec un cycle A nu ; le groupe amine jouait un rôle important dans l'activité alors que la présence d'un ou de plusieurs méthoxyles n'avait qu'une contribution mineure dans l'activité (Suwito *et al.*, 2014).



Composé 3

(*E*)-1-(4-aminophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one
50% d'inhibition de l'activité de l'enzyme *PfFNR* à 100μM

Figure 35. Composé le plus actif sur l'enzyme *Pf* Ferredoxine-NADP⁺ reductase décrit par Suwito *et al.*, 2014

ii. Mitochondrie et apoptose

La mitochondrie unique et l'apicoplaste sont deux organelles étroitement liées chez *Plasmodium* qui auraient des voies métaboliques communes notamment la voie de biosynthèse de l'hème (van Dooren *et al.*, 2006).

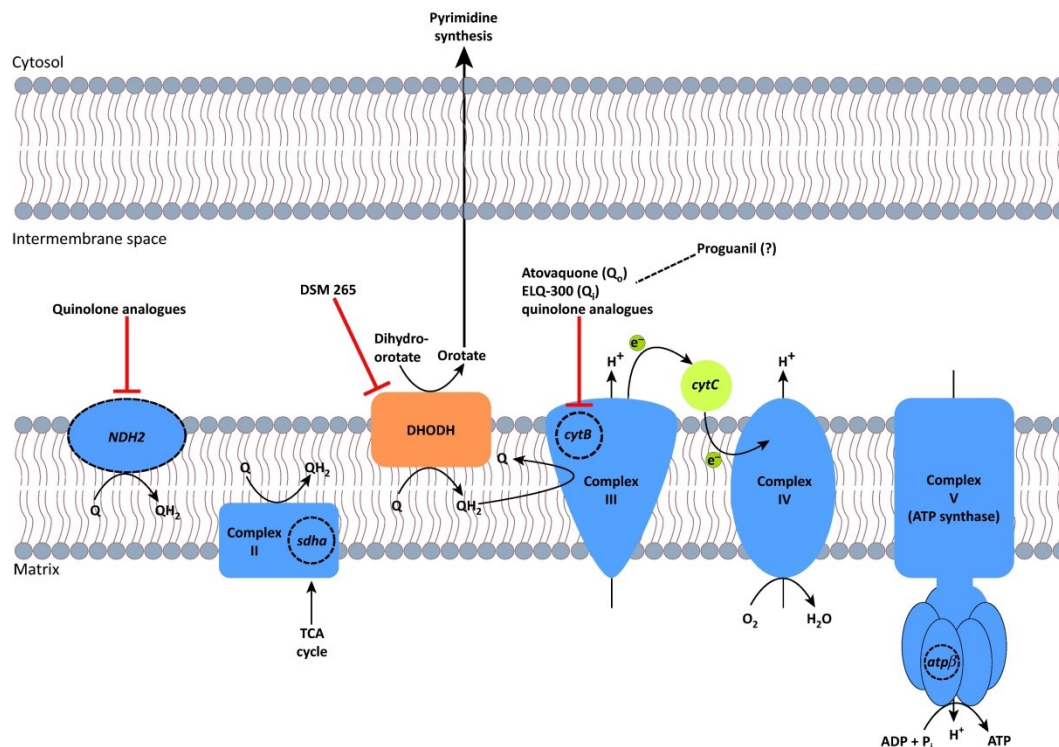


Figure 36. Chaîne respiratoire mitochondriale de *Plasmodium* et ses inhibiteurs. D'après Goodman *et al.*, 2017.

Ces deux organites sont des cibles thérapeutiques validées étant donné que le parasite ne peut pas se développer dans le cas de leur dysfonctionnement. De plus, l'atovaquone, médicament antipaludique utilisé en prévention et en traitement des accès à *Plasmodium*, cible le site Qo du complexe bc_1 de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Mi-Ichi *et al.* ont étudié l'effet de la licochalcone A vis-à-vis de ce complexe bc_1 (ubiquinol-cytochrome *c* reductase) et du complexe II (succinate ubiquinone reductase) faisant partie intégrante de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 37). Ils ont mis en évidence un effet plus important au niveau du complexe bc_1 (IC_{50} 0,10 μ M) que du complexe II (1,3 μ M). Néanmoins la CI_{50} mesurée sur le complexe bc_1 de mitochondries de rat était de 0,077 μ M, la licochalcone A ne présentant donc pas de sélectivité (Mi-Ichi, 2005). Le complexe bc_1 de *Plasmodium* étant différent de celui des mammifères et bien conservé entre les différentes espèces du parasite, c'est une cible intéressante pour la découverte de nouveaux antipaludiques, d'autant plus qu'il comprend deux sites : Qo qui est comme nous l'avons évoqué, ciblé par l'atovaquone, et Qi, alternative thérapeutique intéressante pour cibler les parasites résistants à l'atovaquone. Les composés de la famille des ELQ (*endochin-like quinolone*),

dont certains inhibent les deux sites, ont d'ailleurs une structure proche de celle des isoflavonoïdes (**Figure 37**) (Stickles *et al.*, 2015).

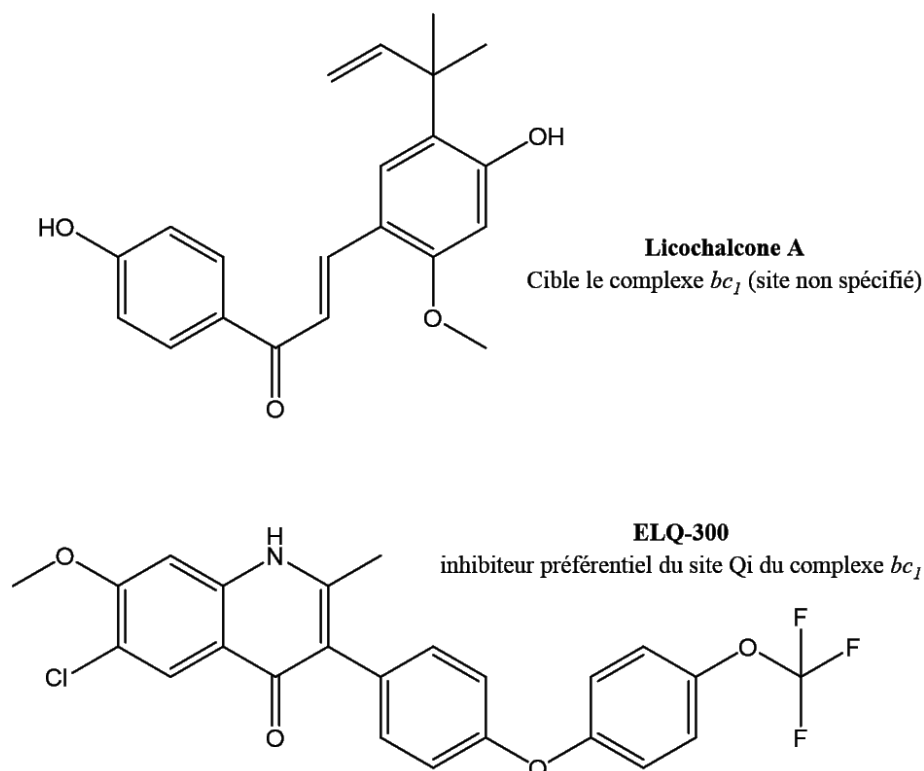


Figure 37. Structures de la Licochalcone A et du composé ELQ-300 ciblant le complexe bc_1 de la chaîne respiratoire mitochondriale de *Plasmodium* (Mi-Ichi, 2005; Stickles *et al.*, 2015)

Concernant les isoflavonoïdes, Salvi *et al.* ont étudié l'effet de la génistéine sur la mitochondrie (**Figure 39**). Ils ont mis en évidence que l'incubation de mitochondries en présence de génistéine induisait un gonflement de la mitochondrie de façon dose-dépendante. Ce gonflement est accompagné d'une dépolarisation de la membrane mitochondriale et d'un relargage du calcium accumulé. Ces effets sont inhibés par la présence de cyclosporine A et d'acide bongkréique, deux inhibiteurs typiques du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Les auteurs concluent donc que l'effet de la génistéine implique l'ouverture de ce pore, induisant un stress osmotique au niveau de la mitochondrie, phénomène qui mène à l'induction des voies de l'apoptose. De plus, l'ajout de dithiothréitol et de N-éthylmaleimide (agents réducteurs) annule également le gonflement de la mitochondrie. Cela confirme donc que le potentiel redox de la mitochondrie est impliqué dans l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale par la génistéine (**Figure 38**). La génistéine génère donc des espèces réactives de l'oxygène, de manière directe ou indirecte (Salvi *et al.*, 2002).

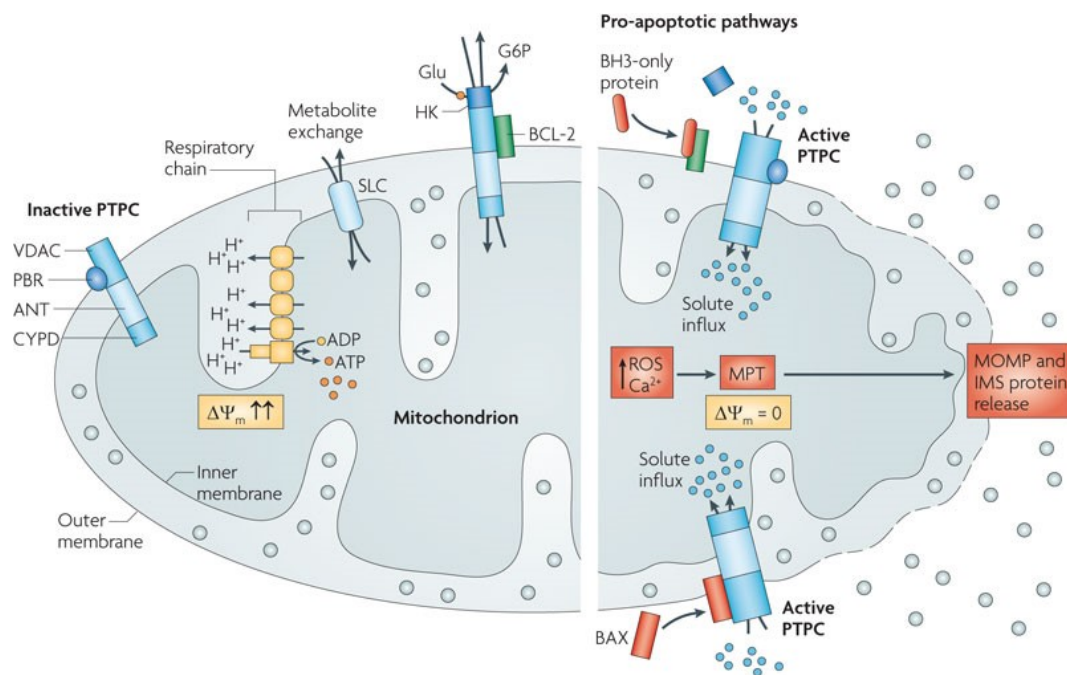


Figure 38. Pore de transition de perméabilité mitochondriale (mitochondrion de cellule de mammifère), d'après Fulda *et al.*, 2010. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPC) est un complexe qui peut être composé du canal anionique voltage dépendant VDAC, inséré dans la membrane externe de la mitochondrie, de l'adénine nucléotide translocase ANT, présente au sein de la membrane interne et de la cyclophiline D (CYPD), une peptidyl-prolyl cis-trans isomérase de la matrice mitochondriale. Dans les conditions physiologiques, la mitochondrie présente un fort potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$), obtenu via la chaîne respiratoire et induisant la génération d'ATP. Dans ces conditions, le pore de transition de perméabilité mitochondriale existe dans un état de faible conductance, état qui serait favorisé par l'interaction avec des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (B-cell lymphoma protein 2), contribuant ainsi à l'échange de petits métabolites entre le cytosol et la matrice mitochondriale (faisant intervenir de façon prédominante les *mitochondrial solute carriers* (SLCs)). Il a également été proposé que le PTPC interagisse avec le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) et avec l'hexokinase (HK) qui utilise l'ATP mitochondrial pour catalyser l'étape limitante de la glycolyse. En réponse à des signaux pro-apoptotiques (accumulation d'espèces réactives de l'oxygène ROS et surcharge en ions Ca^{2+}), le PTPC va changer de conformation et permet l'entrée déréglée de petits solutés dans la matrice mitochondriale via des forces électrochimiques. La transition de perméabilité mitochondriale peut être induite par des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2, comme la *BCL-2 associated X protein* (BAX) qui interagit de façon directe avec le PTPC ou des protéines BH3-only, qui inhibe l'effet anti-apoptotique de BCL-2. La transition de perméabilité mitochondriale induit l'annulation immédiate du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) et un gonflement osmotique de la matrice mitochondriale, qui mène éventuellement à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP)—étant donné que la surface de la membrane interne excède largement celle de la membrane externe—et au relargage cytosolique de protéines cytotoxiques, normalement confinées dans l'espace intermembranaire mitochondrial (IMS). Ces protéines sont des activateurs de caspase comme la cytochrome c et DIABLO, ou l'endonucléase G qui est un activateur de mort cellulaire indépendant des caspases (Fulda *et al.*, 2010).

Cheema et son équipe ont décrit un effet similaire pour un autre isoflavonoïde, la glabridine (**Figure 39**). Ils ont décrit la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) après traitement à 0,75 ; 1 et 1,25 x la CI_{50} (24 μM), qu'ils imputent à l'inhibition de la pLDH qu'ils ont observé *in silico*. La présence de ROS induit une dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial, l'activation de caspases et une fragmentation de l'ADN, synonyme d'induction de l'apoptose. La pLDH est une enzyme essentielle pour la production d'énergie mais qui peut également induire une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (NO). C'est son inhibition qui, selon les auteurs, induirait la cascade d'événements menant à l'apoptose. Les caspases de *Plasmodium* sont peu caractérisées, néanmoins une mort médiée par le stress oxydant a été décrite chez *Leishmania donovani*, qui n'exprime pas les caspases classiques mais qui possède des protéases s'apparentant à la

caspase-3 (Deponete, 2008). La glabridine induirait donc l'apoptose du parasite *via* l'inhibition de la pLDH (Cheema *et al.*, 2014).

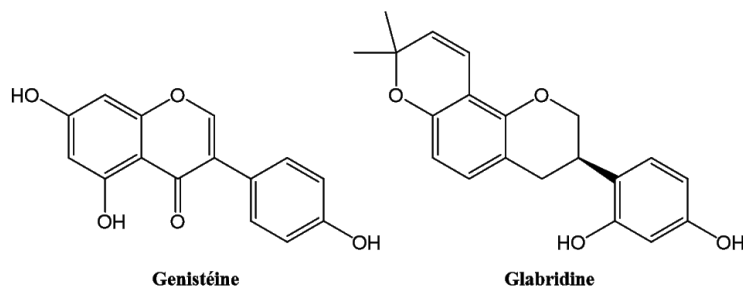


Figure 39. Structures de la génistéine et de la glabridine, deux isoflavonoïdes décrits pour induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène et mener à l'apoptose de *Plasmodium* (Cheema *et al.*, 2014; Salvi *et al.*, 2002).

Un gonflement de la mitochondrie a également été observé par Fonseca-Silva *et al.* sur des promastigotes de *Leishmania amazonensis* traités par 96 μM d'apigénine (concentration correspondant à 4 fois la CI_{50}). Les auteurs ont mis en évidence la génération d'espèces réactives de l'oxygène responsables d'une diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie, de son gonflement et de la déstabilisation de sa membrane interne (Figure 40). Le traitement par l'antioxydant *N*-acetyl-l-cystéine en présence d'apigénine augmente la survie du parasite et diminue la génération de ROS. Ils ont également mis en évidence une vacuolisation cytoplasmique (Fonseca-Silva *et al.*, 2015).

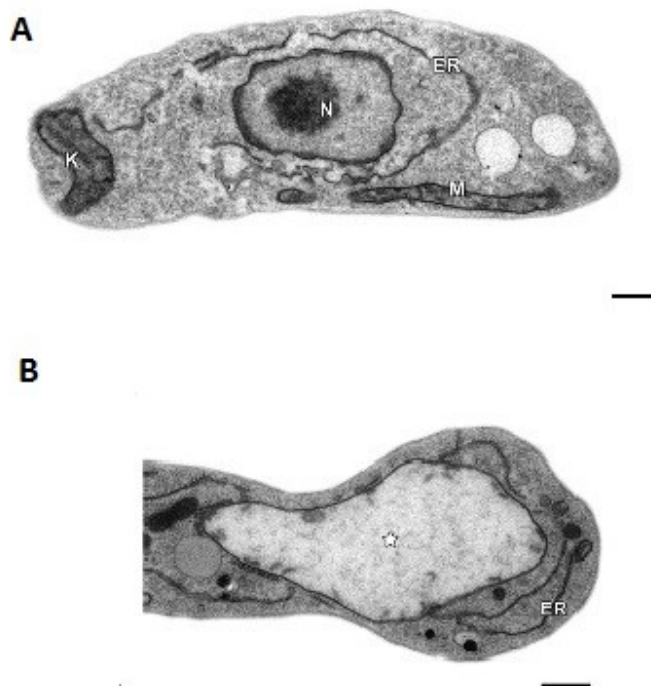


Figure 40. Coupes obtenues par microscopie électronique à transmission de promastigotes de *L. amazonensis* non traités (A) ou après traitement de 24h par 96 μM d'apigénine (4 x CI_{50}). Noyau (N), kinétoplaste (K), réticulum endoplasmique (ER), mitochondrie (M). Le traitement par apigénine induit un gonflement important de la mitochondrie (*). Echelle = 0,5 μm . Adapté d'après Fonseca-Silva *et al.*, 2015

Clavin et ses collaborateurs ont également observé une vacuolisation des parasites *Trypanosoma cruzi* (épimastigotes) et *Leishmania mexicana* (promastigotes) après traitement par des flavones naturelles mais les vésicules étaient uniquement présentes dans le cytoplasme cette fois-ci et non au sein de la mitochondrie. Ils ont également mis en évidence un gonflement du kinétoplaste (Clavin *et al.*, 2016). Les concentrations utilisées correspondaient à deux à dix fois la CI_{50} , soit l'équivalent de ce qui avait été utilisé dans l'étude de Fonseca-Silva, les flavones concernées semblent donc induire un effet différent de la génistéine.

Dans une autre étude, Sharma *et al.* ont montré l'effet pro-apoptotique d'hybrides de chalcones et de stilbènes. Ils ont mis en évidence un rétrécissement du parasite, une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et une perte du potentiel de membrane mitochondriale après traitement de 18 à 24 heures par les deux composés les plus actifs de la série à une concentration équivalente à l' IC_{100} de chaque composé ($IC_{50} \approx 2 \mu M$). La condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN a pu être observée en marquant l'ADN parasitaire par le fluorophore Hoescht 33342, la fragmentation étant plus importante au stade trophozoïte qu'au stade anneau. Ils ont mis en évidence la perte du potentiel mitochondrial par l'utilisation du marqueur de la mitochondrie JC-1, dont la longueur d'onde d'émission de fluorescence varie en fonction du potentiel de membrane mitochondrial (apparaît rouge en cas de potentiel membranaire intact et vert si le potentiel membranaire est perdu). Les auteurs concluent donc que les hybrides de chalcone-stilbène induisent leur effet antipaludique par l'induction de l'apoptose du parasite, mais ne décrivent pas l'origine de cet effet. Ils insistent néanmoins sur le fait que ces composés présentent un indice de sélectivité supérieur à 45 et que l'effet pro-apoptotique peut donc être plus ou moins spécifique au parasite sans impacter les cellules de mammifères (Sharma *et al.*, 2012).

En conclusion, un effet pro-apoptotique a été mis en évidence pour plusieurs classes de flavonoïdes (isoflavonoïdes, flavones, chalcones) et sur deux protozoaires différents (*Plasmodium* et *Leishmania*). Ce mode d'action semble impliquer la génération d'espèces réactives de l'oxygène, soit de manière indirecte via l'inhibition de la pLDH, soit de manière directe par un effet pro-oxydant. Les flavonoïdes sont essentiellement connus pour leur effet anti-oxydant mais la réalité est beaucoup plus complexe : ils peuvent agir en tant que pro-oxydants ou anti-oxydants en fonction de leur structure, de leur concentration, d'une source de radicaux libre ou de la présence de métaux de transition. Les trois types de châssis, flavones, isoflavones et flavanones, agissent en tant qu'anti-oxydants en présence de radicaux peroxy ($ROO\bullet$) et hydroxyle ($OH\bullet$) mais ont des propriétés pro-oxydantes en présence d'ions Cu^{2+} . Ces deux propriétés dépendent du nombre de substitutions hydroxyles libres présentes sur le noyau : l'augmentation de leur nombre augmente les propriétés pro- et anti-oxydantes. La seule substitution par un hydroxyle en position 5 n'est pas suffisante pour induire un effet alors que la double substitution des positions 3' et 4' paraît particulièrement importante pour l'absorption des radicaux libres. La conjugaison entre les cycles A et B (insaturation de la liaison C_2-C_3) n'affecte pas

l'activité anti-oxydante mais a un rôle primordial dans l'effet pro-oxydant des flavonoïdes médié par le cuivre. Enfin, la méthylation des hydroxyles annule les propriétés pro- et anti-oxydantes des flavonoïdes (Cao *et al.*, 1997). Quelle que soit la façon dont ces radicaux libres sont générés, ils vont mener à une perte de potentiel mitochondrial, probablement médié par l'activation du complexe de transition de perméabilité mitochondriale, qui va induire un stress osmotique au sein de la mitochondrie et mener à son gonflement. De plus, des signaux pro-apoptotiques vont être émis et induire les phénomènes de condensation de la chromatine, de fragmentation de l'ADN et une modification de la perméabilité membranaire, qui vont mener à la mort du parasite. Ces effets semblent relativement sélectifs par rapport à des cellules de mammifères, peut-être dû au fragile équilibre redox auquel font face les parasites tout comme les cellules cancéreuses (cellules à renouvellement rapide qui font appel à la glycolyse anaérobie).

iii . Hémoglobine

a . Protéases impliquées dans la digestion de l'hémoglobine

Avant d'évaluer l'effet pro-apoptotique des hybrides chalcone-stilbène qu'ils ont synthétisés, Sharma et son équipe se sont d'abord intéressés à l'effet vis-à-vis de la falcipaine-2, une protéase parasitaire impliquée dans la dégradation de l'hémoglobine (**Figure 41**). En effet, ils ont mis en évidence que ces composés ciblent spécifiquement les stades anneau et trophozoïte mais n'ont pas d'effet au stade schizonte ni sur la libération des mérozoïtes ou le processus d'invasion de l'hématie. Ils ont donc cherché une cible commune aux stades anneau et trophozoïte. La falcipaine-2 est présente à ces deux stades de développement du parasite et certaines chalcones ont été décrites pour leur effet inhibiteur vis-à-vis de cette enzyme. L'évaluation des deux composés les plus actifs de leur série ($CI_{50} \approx 2 \mu M$) vis-à-vis de cette enzyme a donné des résultats non cohérents avec l'activité antipaludique, les CI_{50} obtenues pour la falcipaine-2 étant de 37,5 et 25 μM (Sharma *et al.*, 2012).

Jin *et al.* se sont intéressés à l'inhibition des protéases plasmepsine II et falcipaine-2 par des flavonoïdes naturels. Deux flavonols se sont avérés actifs sur les deux enzymes : la myricétine et la fisétine (**Figure 42**). D'autres comme le kaempférol, la lutéoline, la quercétine et la morine se sont avérés actifs vis-à-vis de la falcipaine-2 (CI_{50} entre 1,7 et 3,3 μM) mais n'ont pas d'activité vis-à-vis de la plasmepsine II ($IC_{50} > 10 \mu M$). Etant donné que les parasites *knock-out* pour la falcipaine-2 ou d'autres falcipaines de *Plasmodium* impliquées dans la digestion de l'hémoglobine prises individuellement n'ont pas d'effet létal pour le parasite *in vitro* (leurs fonctions semblent donc redondantes, du moins pour les stades sanguins) (Omara-Opyene *et al.*, 2004) et que la falcipaine-2 et la plasmepsine II semblent agir en synergie (Semenov *et al.*, 1998), les auteurs ont décidé de se concentrer sur l'étude des inhibiteurs des deux enzymes, la myricétine et la fisétine (Jin *et al.*, 2014). Ces deux flavonols avaient été décrits par Tasdemir *et al.* pour avoir des activités de 8,2 μM et 57,3 μM respectivement pour la souche sensible NF54 et 6,5 μM et 12,9 μM respectivement vis-à-vis

de la souche K1 multirésistante de *P. falciparum* (Tasdemir *et al.*, 2006). Les activités obtenues vis-à-vis des deux protéases impliquées dans la première étape de la digestion de l'hémoglobine (**Figure 42**) pourraient correspondre à l'effet observé vis-à-vis du parasite. Mais ces composés présentaient également des activités intéressantes vis-à-vis des enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras décrites dans la partie C.2.i.a. qui pourraient expliquer également leur effet (Tasdemir *et al.*, 2006).

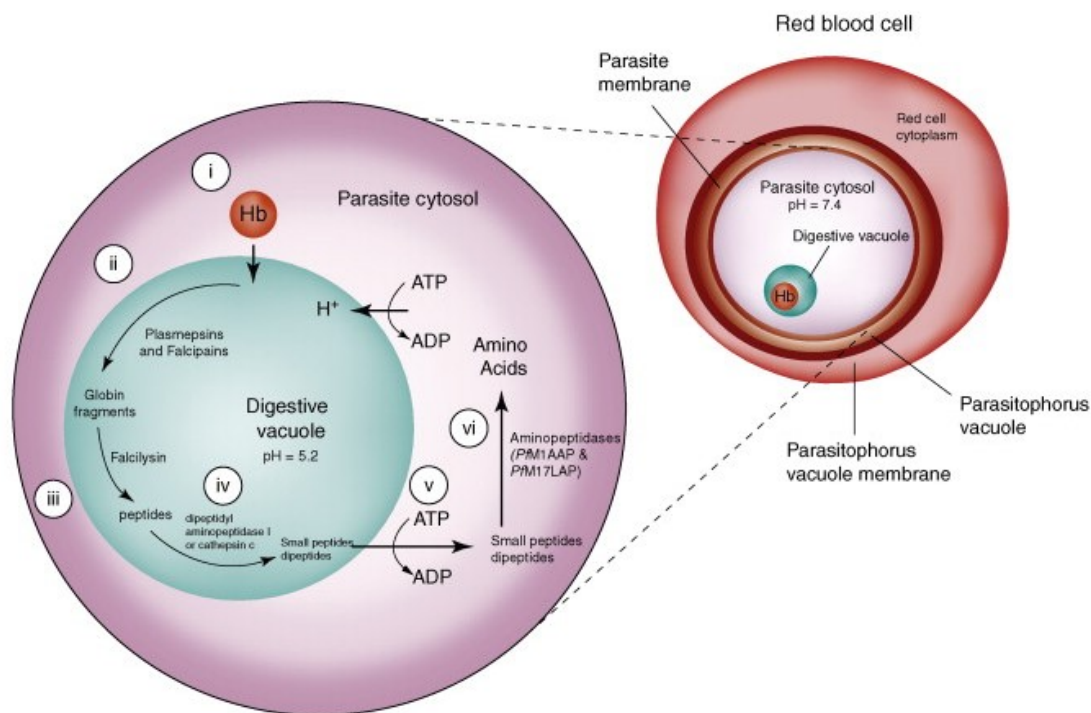


Figure 41. Etapes de la digestion de l'hémoglobine par *P. falciparum* et enzymes impliquées. D'après Skinner-Adams *et al.*, 2010

Jin *et al.* ont également réalisé une étude de *docking* de la série de composés qu'ils ont évalués vis-à-vis des deux protéases. Concernant la falcipaïne-2, les hydroxyles en position 3 et 7 semblent essentiels à l'inhibition. De tous les composés évalués, seule la lutéoline ne présente pas d'hydroxyle en C3 mais est hydroxylée en C5 et C7. Le groupement hydroxyle en position 3 semble créer un pont hydrogène avec l'histidine 174 au sein du site actif de l'enzyme. Il en est de même pour la plasmepsine II où les hydroxyles en positions 3 et 3' sont important dans le processus de reconnaissance et d'inhibition. Les isoflavonoïdes évalués, dont le cycle B est attaché en position 3, n'avaient que peu d'effet vis-à-vis de la plasmepsine II. Seuls quatre des composés testés présentent une structure comprenant deux hydroxy en 3 et 3', dont la myricétine, la quercétine, la distyline et la fisétine. Le dihydroflavonol distyline, qui présente une structure plus flexible que les flavonols, était quasi inactif à 10 μM . Les trois autres flavonols présentaient tous une activité vis-à-vis des deux enzymes, bien que la quercétine soit légèrement moins active ($\text{CI}_{50} \approx 10 \mu\text{M}$). Concernant les interactions au sein du site actif de la plasmepsine II, l'hydroxyle en position 3 interagit avec l'asparagine 214 intervenant dans le domaine catalytique, tandis que l'hydroxyle en C3' interagit avec

la sérine 79 présente sur un repli de la protéine dont l'effet probable est la fermeture de la cavité qui englobe les inhibiteurs (Jin *et al.*, 2014).

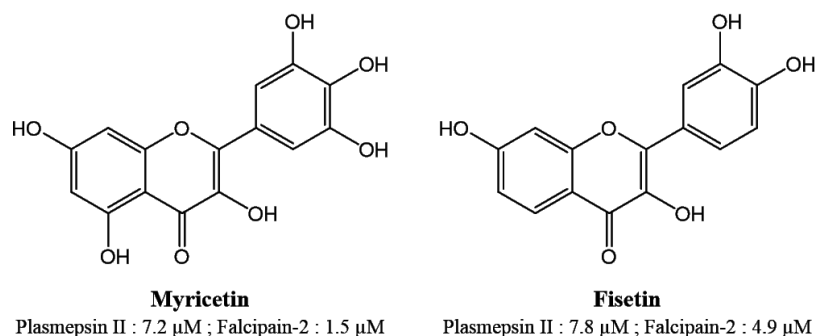


Figure 42. Composés flavonoïdiques les plus actifs de l'étude de Jin *et al.*, présentant une double inhibition des enzymes plasmepepsine II et falcipaine-2. Les CI_{50} vis-à-vis des deux enzymes sont représentées (Jin *et al.*, 2014)

En conclusion, les flavonols substitués en 3' par un hydroxyle seraient capables d'inhiber les deux premières enzymes de la voie de digestion de l'hémoglobine, néanmoins ces composés ont également été décrits pour leur effet sur les enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras. Cette dernière n'étant apparemment pas indispensable à la survie des stades sanguins de *Plasmodium*, il est fort probable que la myricétine et la fisétine induisent leur effet antipaludique sur les stades sanguins *via* l'inhibition de la digestion de l'hémoglobine par le parasite, qui n'a ainsi plus accès à une source d'acides aminés essentiels à sa survie.

b . Polymérisation de l'hème

Sisodia *et al.* ont évalué l'activité d'hybrides de chalcones et de stéroïdes sur la polymérisation de l'hème, mécanisme impliqué dans l'action de la chloroquine. Le dérivé le plus actif présentait une activité modérée vis-à-vis du parasite (2,1 μM vs *Pf* NF-54) et aucun des dérivés évalués ne présentaient d'activité vis-à-vis de la ferriprotoporphyrine IX dans le test d'inhibition de la biocrystallisation de l'hème ($\text{CI}_{50} > 500 \mu\text{M}$ versus 430,7 μM pour la quinine et 11,7 μM pour la chloroquine) (Deharo *et al.*, 2002; Sisodia *et al.*, 2012).

En revanche, la lanaroflavone a montré des propriétés d'inhibition de la polymérisation de l'hème dans ce même test d'inhibition de la biocrystallisation de l'hème (Deharo *et al.*, 2002). En effet, elle présentait une CI_{50} de 74 μM contre 114 μM pour la quinine (**données non publiées**), suggérant un effet antipaludique de la lanaroflavone par ce biais.

iv . Division parasitaire

Les processus de réplication et de transcription de l'ADN induisent une contrainte structurale (topologique). Les topoisomérases sont des enzymes qui permettent de limiter le surenroulement de l'ADN lors de ces processus et sont donc essentielles à la viabilité de tous les organismes. En fonction

de leur système catalytique, on distingue les topoisomérases de type I, qui coupent un seul brin d'ADN, et celles de type II qui coupent les deux brins d'ADN.

Srivastava *et al.* ont décrit l'activité de chalcones et bichalcones synthétiques sur l'ADN-topoisomerase II. Ces composés ont une activité faible (7 à 100 % d'inhibition à une concentration de 2 mg/ml vis-à-vis de l'enzyme de *P. berghei*). Bien que les auteurs concluent que l'effet observé *in vitro* vis-à-vis de l'enzyme purifiée peut expliquer l'effet observé sur le parasite, la hauteur des concentrations utilisées permet de douter de cette conclusion (Srivastava *et al.*, 2008).

v. *New permeability pathways* et membrane de l'érythrocyte

Plusieurs références bibliographiques font état d'un effet inhibiteur de flavonoïdes vis-à-vis des canaux anionique exportés par le parasite à la membrane de l'érythrocyte, responsables de l'influx de sorbitol et de la lyse du globule rouge en présence de fortes concentrations (> 5 g/l). Plusieurs séries de chalcones naturelles ou synthétiques permettent d'inhiber la lyse induite par le sorbitol — et donc une fermeture des canaux anioniques — avec une CI_{50} cohérente avec celle mesurée vis-à-vis du parasite, au même titre que le furosémide utilisé comme contrôle positif (Go *et al.*, 2004; Silfen *et al.*, 1988; Sisodia *et al.*, 2012). Les dérivés de chalcones semblent donc inhiber les canaux anioniques des *New Permeability Pathways* (NPP) et cette inhibition semble corrélée dans la plupart des cas à l'activité antipaludique constatée.

Ziegler *et al.* ont décrit un effet échinocytogène de la licochalcone A (**Figure 37**) vis-à-vis de globules rouges sains ou parasités, à des concentrations cohérentes avec son activité antipaludique. Cet effet a été également mis en évidence *in vivo* chez la souris après injection intraveineuse de 25 mg/kg. Les auteurs expliquent cet effet par une modification de la structure de la membrane du globule rouge par la licochalcone. De plus, ils ont mis en évidence que la licochalcone exerçait son effet essentiellement à l'étape d'invasion, où la structure membranaire de l'érythrocyte a toute son importance. Les auteurs concluent donc à un effet artefactuel car perturbant essentiellement la membrane du globule rouge et non le parasite (Ziegler *et al.*, 2004).

vi. Effets décrits sur les stades hépatiques, sexués et sur la splénomégalie

Peu d'auteurs ont évalué l'effet des flavonoïdes vis-à-vis des cycles hépatique et sexué du parasite, probablement dû au fait que ces modèles sont moins accessibles.

Helgren *et al.* ont évalué l'activité de deux des flavones les plus actives de leur série vis-à-vis de gamétocytes aux stades jeunes (I-III) et matures (IV-V). Ils ont obtenu des activités modérées de 6,8 à 9,7 μ M pour les stades I-III et une inhibition de 100% des stades IV-V à 40 μ M alors que l'activité mesurée vis-à-vis des stades asexués était d'environ 70 nM pour les deux composés (Helgren *et al.*, 2015).

Rodrigues *et al.* ont obtenu des activités identiques à celle de la primaquine (2 et 10 μM) pour une de leurs flavones substituées en 4' vis-à-vis d'hépatocytes Huh-7 infectés par *P. berghei*. Ce composé ne présentait pas d'activité vis-à-vis des stades sanguins. Un autre composé présentait quant à lui une activité modérée vis-à-vis des stades sanguin et hépatique avec une CI_{50} de 3,9 et 1,9 μM respectivement, la primaquine présentant une CI_{50} de 7,5 μM dans leur modèle d'hépatocytes infectés (Rodrigues *et al.*, 2013). L'isoflavone génistéine (**Figure 39**) permet de réduire l'infection d'hépatocytes *in vitro* avec une CI_{50} d'environ 20 μM (*P. berghei*) et 30 μM (*P. yoelii*). De façon plus intéressante, une diminution de l'infection hépatique d'environ 50 % est également observée chez la souris après administration i.p. d'une dose de 200 mg/kg, juste avant l'inoculation de sporozoïtes de *Plasmodium yoelii* ou *berghei* (1×10^4 /souris) en i.v. Cet effet est identique quand l'administration de la même dose de génistéine se fait par voie orale 6 heures avant l'inoculation du parasite (évalué uniquement pour *P. berghei*). De plus, un régime alimentaire supplémenté en génistéine permettait de réduire l'infection hépatique de façon concentration dépendante quand la concentration plasmatique était prise en compte. Cette diminution de l'infection hépatique était suivie d'une parasitémie plus faible lors de la phase sanguine et d'une survie deux fois plus importante que le contrôle nourri avec un régime alimentaire non supplémenté (Cunha-Rodrigues *et al.*, 2008).

Enfin, il a été montré que la génistéine permet de diminuer la splénomégalie induite par *P. berghei* chez la souris, à une dose de 2 mg/kg (diminution du poids de la rate d'un facteur 2 par rapport au contrôle non traité présentant une parasitémie identique) mais qu'étrangement cet effet était perdu à 10 mg/kg, bien que la taille de la rate soit plus faible que celle du contrôle. Le traitement par génistéine restaure l'architecture histologique de la rate perturbée par *Plasmodium* (Ha *et al.*, 2015).

vii . Conclusion

Les flavonoïdes présentent donc des cibles et mécanismes variés qui ne sont pas toujours corrélés à leur activité mesurée sur le parasite en culture. L'ensemble des cibles plasmodiales des flavonoïdes décrites dans la littérature sont représentées schématiquement dans la **Figure 43**. En effet, l'activité mesurée vis-à-vis d'une enzyme purifiée est en principe plus importante que celle mesurée vis-à-vis du parasite étant donné que dans un test enzymatique la cible est directement accessible (pas de passage transmembranaire) et concentrée. De plus, l'effet mesuré vis-à-vis de l'enzyme peut ne pas être lié à l'effet observé lors du test phénotypique notamment si son inhibition peut être compensée par une voie métabolique redondante, rendant la cible non indispensable à la survie du parasite. L'obtention d'une activité mesurée *in vitro* vis-à-vis d'une enzyme comparable à celle mesurée via un test phénotypique doit donc mettre en doute le fait que cette enzyme soit réellement impliquée dans le mécanisme d'action. Par ailleurs, certains flavonoïdes présentent des activités modérées vis-à-vis des stades sexués et hépatiques de *Plasmodium*.

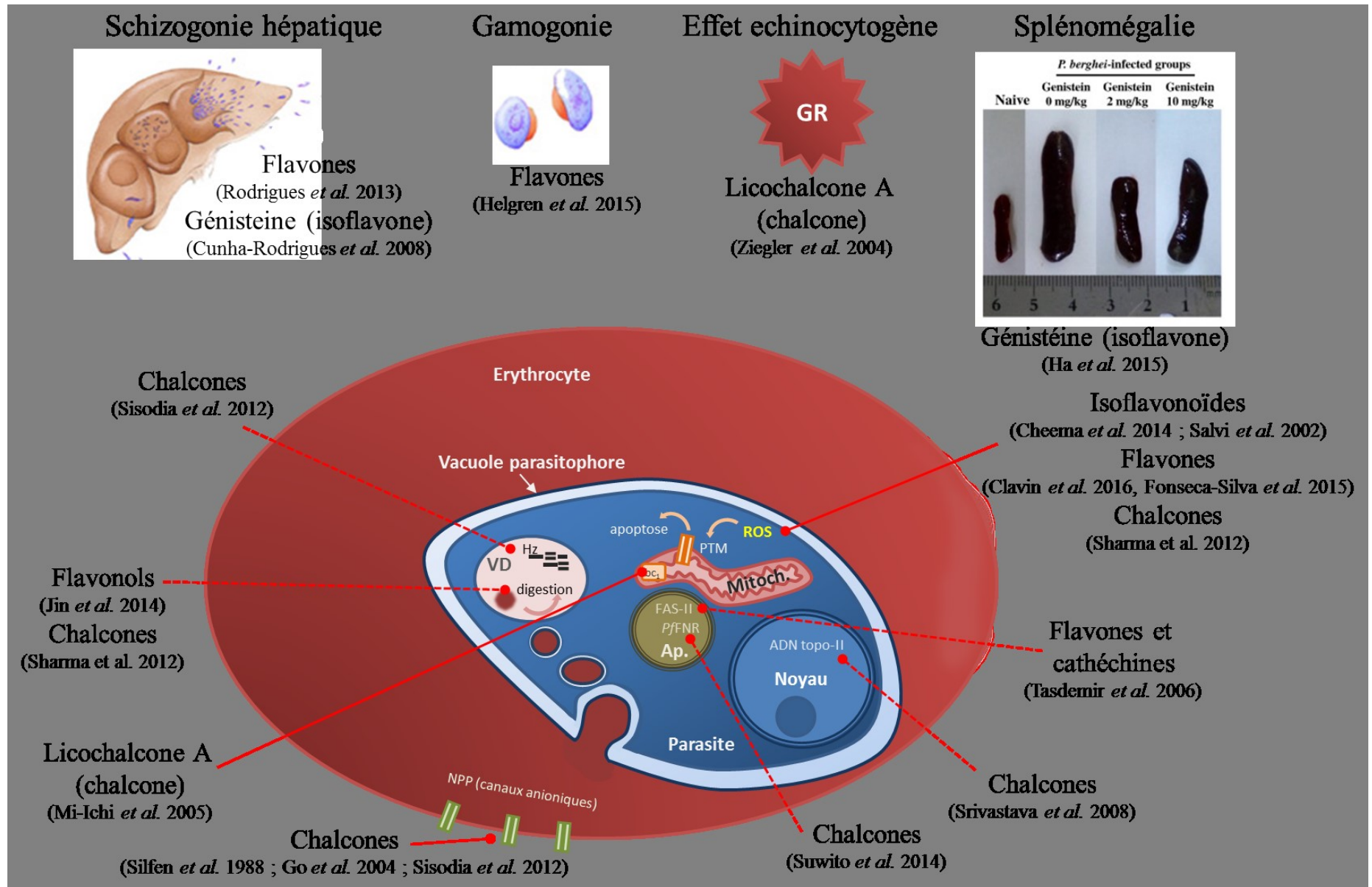


Figure 43. Schéma récapitulatif des cibles plasmodiales des flavonoïdes décrites dans la littérature. Les traits pleins rouges représentent les mécanismes qui pourraient potentiellement être liés à l'activité observée sur le parasite au vu des concentrations utilisées, les traits rouges en pointillés représentent les mécanismes peu probables. VD = vacuole digestive, Hz = hémzoïne, Mitoch. = mitochondrie, ROS = espèces réactives de l'oxygène, PTM = pore de transition mitochondriale, Ap. = apicoplaste, P/FNR = Ferredoxine-NADP⁺ reductase ; Fas-II = voie de biosynthèse des acides gras ; ADN topo-II = ADN topoisomérase-II, NPP = *new permeability pathways*.

D . Contexte et objectifs de la thèse

L'origine de ce projet remonte à une enquête ethnobotanique de terrain réalisée en Colombie par Bernard Weniger dans les années 2000, qui a permis de recenser des plantes utilisées traditionnellement pour traiter des maladies parasitaires dans la région côtière pacifique (paludisme, leishmaniose, trypanosomiasis). 44 plantes ont ainsi été sélectionnées sur des critères ethnopharmacologiques, chimiotaxonomiques ou bibliographiques. Différents extraits polaires et apolaires ont ensuite été réalisés. Un extrait s'est avéré particulièrement actif *in vitro* vis-à-vis de *P. falciparum* cultivé dans des globules rouges humains. Il s'agit du macérat méthanolique des feuilles de *Camposperma panamense* Standl. (Anacardiaceae), dont la CI_{50} est de 8 $\mu\text{g/ml}$ sur la souche K1 multirésistante de *P. falciparum* (Weniger *et al.*, 2001).

L'isolement bioguidé des principes actifs responsables de l'activité observée a permis d'identifier un biflavonoïde contribuant à l'activité : la lanaroflavone, une bi-apigénine (5,5'',7,7'',4'''-pentahydroxy-4',8''-biflavonyl ether). Cette molécule présente une CI_{50} de 480 nM vis-à-vis de *P. falciparum* (souche multi-résistante K1) et un indice de sélectivité de 159 (Weniger *et al.*, 2004). Les deux unités flavones qui composent cette molécule sont reliées par un pont éther engageant les carbones C8 et C4'''. Les liaisons C-O-C sont moins fréquentes que les liaisons C-C entre deux sous-unités de biflavones. Afin de faciliter la lecture du manuscrit, la structure de la lanaroflavone est présentée dans le rabat du quatrième de couverture de ce manuscrit. Cette molécule présentait donc une activité intéressante en plus d'une structure originale car aucun des antipaludiques actuellement sur le marché ou en développement ne présente de châssis moléculaire comparable (Wells *et al.*, 2015). La lanaroflavone ne présentait cependant pas d'activité *in vivo* quand administrée à des souris impaludées par *P. berghei* ANKA (modèle murin de paludisme) selon le « *four day suppressive test* » ou « test d'inhibition des quatre jours » de Peter et ce, quelle que soit la voie d'administration (intrapéritonéale — i.p., intraveineuse — i.v., per os — p.o., collaboration *Swiss Tropical and Public Health Institute*, Swiss THPI).

L'absorption ne semble pas jouer un rôle dans l'absence d'activité observée *in vivo* puisque la molécule a été initialement découverte *via* un test phénotypique qui présente l'avantage de sélectionner des composés capables de traverser les membranes biologiques (membrane plasmique de l'hématie, vacuole parasitophore et membrane plasmique du parasite). De plus, le fait que le composé soit inactif quelle que soit la voie d'administration utilisée confirme que l'absorption ne semble pas jouer un rôle important dans l'activité, la voie intraveineuse ne présentant pas d'étape d'absorption. Il semble donc que ce soit plutôt un phénomène de métabolisme qui soit à l'origine de l'inactivité *in vivo* de la lanaroflavone. Cette hypothèse est étayée par le fait que Konziase et son équipe ont récemment décrit un biflavonoïde isolé de *Garcinia kola* présentant une activité de 160 nM vis-à-vis de *P. falciparum* FCR-3 et un indice de sélectivité supérieur à 900. Ce composé, actif *in vivo*, présente une DE_{50} d'environ 100 mg/kg vis-à-vis de *P. berghei* ANKA dans le modèle des 4 jours de Peter

(Konziase, 2015). Ce biflavonoïde présente une structure proche de la lanaroflavone excepté que c'est une biflavanone et que la liaison entre les deux sous unités est de type C8-C3'' et non une liaison éther C8-O-C4''' (Figure 44). La différence d'activité ne semble pas due au noyau flavanone, la 5,7,4'-trihydroxyflavonone étant 8 fois moins active *in vitro* que son analogue flavonique, l'apigénine (141,1 µM vs 17,4 µM vis-à-vis de *P. falciparum* NF-54, respectivement) (Tasdemir et al., 2006). Il semble donc probable que l'inactivité de la lanaroflavone *in vivo* soit due à l'hydrolyse du pont éther, donnant lieu à une apigénine, décrite comme peu active dans la littérature [CI₅₀ *P. falciparum* 17,4 à 92 µM, (Kraft et al., 2003; Tasdemir et al., 2006)].

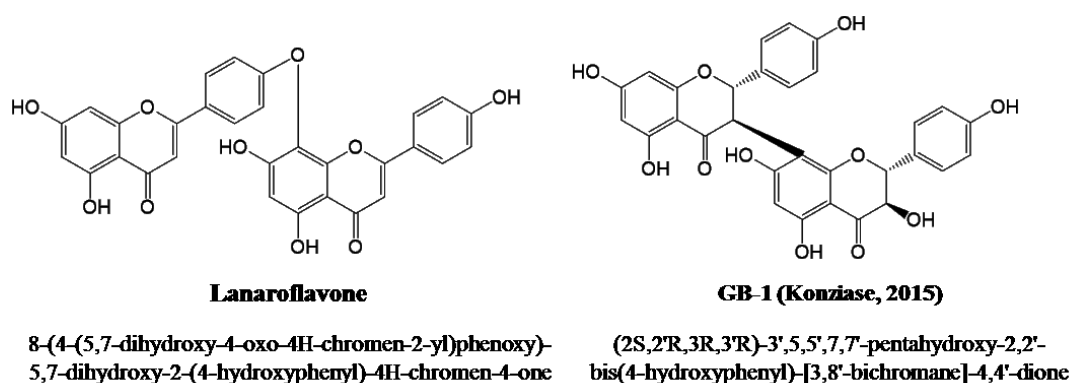


Figure 44. Structures de la lanaroflavone et de GB-1, biflavanone active *in vivo* dans un modèle murin de paludisme décrite par Konziase, 2015

Sur la base de cette hypothèse d'instabilité métabolique de la lanaroflavone, une étude de type Relation Structure-Activité préliminaire été entreprise afin de déterminer les positions essentielles à l'activité et de simplifier la structure la molécule pour améliorer sa stabilité métabolique. Cette étude a été réalisée à partir de biflavonoïdes naturels (Weniger et al., 2006) et de flavones simples présents dans la chimiothèque patrimoine du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200) (Figure 45).

Il ressort de cette étude que la substitution en position 2' est défavorable à l'activité (datiscetine et morine inactives). La présence d'un sucre semble également défavorable même si la vitexine est le seul représentant, dont le glucose en position 8 diminue certainement le passage transmembranaire. Les représentants les plus actifs de la série sont la chryisine (5,7-dihydroxyflavone), la fisétine (3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) et la quercétine (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone). En revanche, l'absence d'hydroxyle en position 3' ou la présence d'un hydroxyle en position 5' entraîne la perte d'un log d'activité (kaempférol et myricétine vs quercétine). Le cycle B ne doit donc pas être trop substitué et la di-substitution des positions 3' et 4' semble importante à l'activité. La substitution en position 3 est bénéfique ou défavorable en fonction des autres positions substituées (flavone vs flavonol ; chryisine vs galangine).

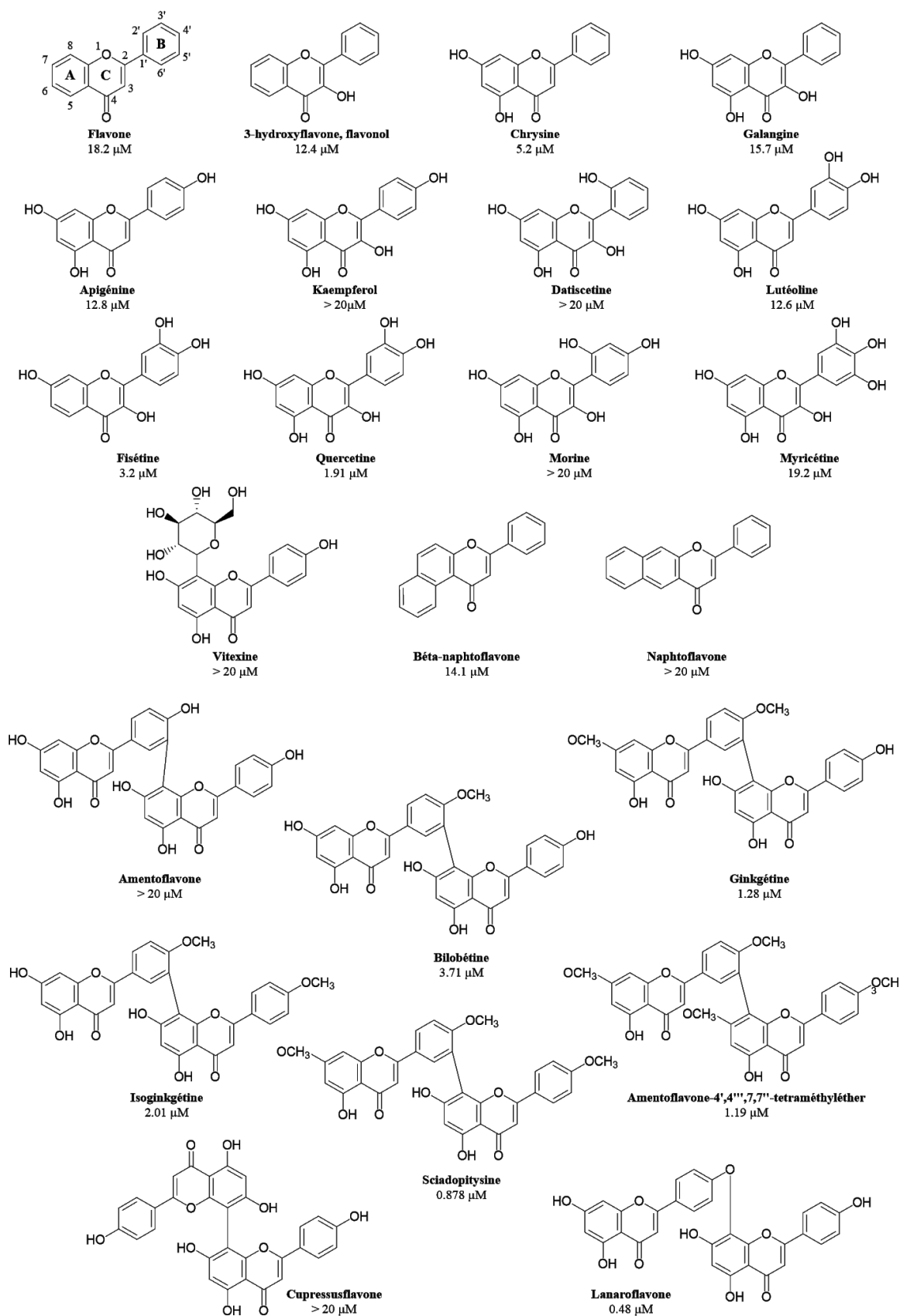


Figure 45. Flavones et biflavonoïdes présents dans la chimiothèque patrimoine de l'UMR7200 évalués biologiquement vis-à-vis de *P. falciparum* K1 dans le cadre de l'étude préliminaire de relation structure-activité (CI_{50} , test d'incorporation de l'hypoxanthine tritiée, coll. Swiss TPHI). Flavones : données non publiées, biflavones : Weniger *et al.*, 2006.

Concernant les biflavonoïdes, ils possèdent tous une liaison carbone-carbone entre les deux sous-unités excepté la lanaroflavone. Une substitution en position 4' semble importante étant donné que les CI_{50} des composés méthoxylés et de la lanaroflavone sont inférieures à 4 μM (bilobétine, ginkgétine, isoginkgétine, sciadopitysine, amentoflavone-4',4'',7,7''-tétraméthyléther), tandis que les composés hydroxylés sont inactifs (amentoflavone, cupressusflavone). L'activité semble également augmenter avec le nombre de groupement méthoxy. La lanaroflavone, l'amentoflavone et la cupressusflavone sont toutes trois des bi-apigénines et pourtant possèdent des activités antipaludiques nettement différentes. La seule différence entre ces composés étant le type de liaison entre les 2 sous-unités flavones, c'est la **liaison éther entre les positions 8 et 4'''** qui semble conférer à la lanaroflavone son activité submicromolaire (Weniger *et al.*, 2006). D'après les données de la littérature publiées depuis, les biflavanones reliées par une liaison C3-C3'' ou C3-C8'' possèdent également des activités submicromolaires [0,15 à 0,97 μM (Ichino *et al.*, 2006; Konziase, 2015; Nunome *et al.*, 2004)] mettant en exergue l'importance des positions 3 et 8.

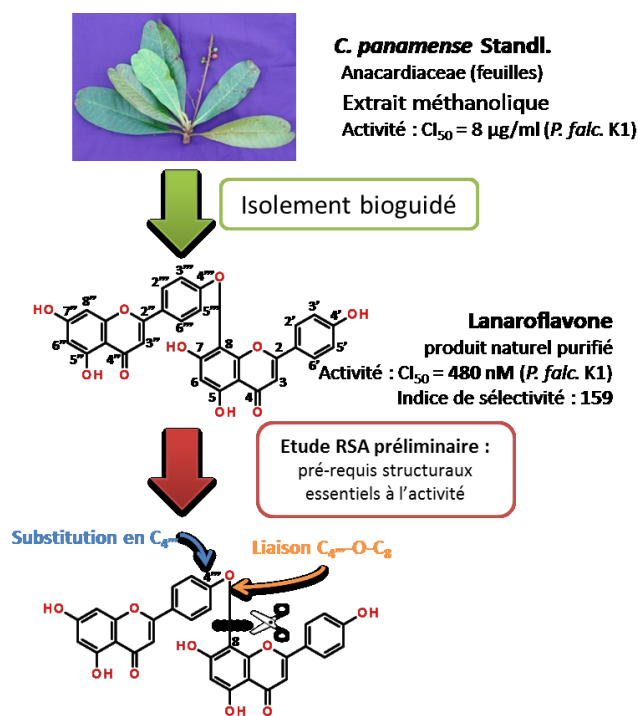


Figure 46. Contexte et résultats antérieurs à la thèse.
P. falc. = *P. falciparum* ; RSA = Relation Structure-Activité.

Objectifs généraux de la thèse et stratégie adoptée

Sur la base de ces résultats, une étude de RSA approfondie a alors été entreprise afin de simplifier la structure de la lanaroflavone et d'identifier les groupements fonctionnels indispensables à l'activité antipaludiale et à la biodisponibilité, ainsi que leur influence sur celles-ci. La lanaroflavone étant constituée de deux unités apigénine, une unité flavone simple a été conservée et a été décorée par des

groupements en positions clés pour réduire la masse moléculaire. Trois objectifs principaux m'ont ainsi été proposés :

- i) Démontrer l'intérêt pharmacologique de la série chimique et notamment faire la preuve de concept de l'activité *in vivo* de flavones substituées dans un modèle murin de paludisme ;
- ii) Explorer le mécanisme d'action sous-jacent à l'activité d'un composé tête-de-série à identifier, voire de ses dérivés synthétiques obtenus en iii) ;
- iii) Optimiser l'activité du composé tête-de-série en réalisant l'évaluation pharmacologique et l'analyse de l'étude de RSA.

La stratégie mise en place pour répondre aux objectifs a été :

- i) De réaliser une revue exhaustive de la bibliographie flavonoïdes/paludisme afin de nous assurer du caractère inédit des séries envisagées ;
- ii) D'évaluer les propriétés antipaludiques des analogues synthétiques (modèles *in vitro* de paludisme asynchrones et synchronisés, cinétique d'action et comportement en association avec des médicaments sur le marché ; modèle *in vivo* de paludisme), leurs propriétés physico-chimiques (solubilité : LogD) et pharmacocinétiques (inhibition des cytochromes P450, profil plasmatique chez la souris), pour les composés les plus prometteurs ;
- iii) D'évaluer la sélectivité d'activité *in vitro* vis-à-vis d'autres protozoaires (Apicomplexes : *T. gondii*, *B. divergens* ; Kinétoplastidés : *T. brucei* et *L. donovani*, collaboration externe pour ces deux derniers parasites : M. Kaiser, Swiss-THPI, Bâle) et de cellules de mammifères vis-à-vis de différentes lignées cellulaires (L6—myoblastes de rats, Hepa1.6—hépatocytes de souris, pNHDF—culture primaire de fibroblastes humains, ThP1—lignée de monocytes humains dérivés d'une leucémie)
- iv) D'évaluer l'activité antipaludique des composés les plus prometteurs sur des souches de *Plasmodium* couramment utilisées en laboratoire et des isolats cliniques de *Plasmodium* présentant différents patterns de résistance ;
- v) De générer un clone résistant au composé tête-de-série permettant d'ouvrir des perspectives d'identification de cible potentielle par génomique fonctionnelle.

Ainsi, la **première partie** des travaux présentée sera consacrée aux propriétés pharmacologiques du composé tête-de-série, **la seconde** à l'exploration du mécanisme d'action et **la troisième** à l'optimisation du composé tête-de-série par l'analyse de l'étude de relation structure-activité approfondie.

Bibliographie du chapitre état de l'art et contexte de l'étude

Abdalla, M.A., and Laatsch, H. (2012). Flavonoids from Sudanese *Albizia zygia* (Leguminosae, Subfamily Mimosoideae), a Plant with Antimalarial Potency. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 9, 56–58.

Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Rosenthal, P.J., and D'Alessandro, U. (2011). Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal* 10, 144.

Adams, M., Plitzko, I., Kaiser, M., Brun, R., and Hamburger, M. (2009). HPLC-profiling for antiplasmodial compounds—3-Methoxycarpachromene from *Pistacia atlantica*. *Phytochemistry Letters* 2, 159–162.

Adelekan, A.M., Prozesky, E.A., Hussein, A.A., Ureña, L.D., van Rooyen, P.H., Liles, D.C., Meyer, J.J.M., and Rodríguez, B. (2008). Bioactive Diterpenes and Other Constituents of *Croton steenkampianus*. *J. Nat. Prod.* 71, 1919–1922.

Ahmed, M.S., Galal, A.M., Ross, S.A., Ferreira, D., ElSohly, M.A., Ibrahim, A.-R.S., Mossa, J.S., and El-Feraly, F.S. (2001). A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. *Phytochemistry* 58, 599–602.

Amato, R., Lim, P., Miotto, O., Amaratunga, C., Dek, D., Pearson, R.D., Almagro-Garcia, J., Neal, A.T., Sreng, S., Suon, S., *et al.* (2017). Genetic markers associated with dihydroartemisinin–piperaquine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype–phenotype association study. *The Lancet Infectious Diseases* 17, 164–173.

Andayi, A.W., Yenesew, A., Derese, S., Midiwo, J.O., Gitu, P.M., Jondiko, O.J., Akala, H., Liyala, P., Wangui, J., Waters, N.C., *et al.* (2006). Antiplasmodial Flavonoids from *Erythrina saculeuxii*. *Planta Medica* 72, 187–189.

Atay, I., Kirmizibekmez, H., Kaiser, M., Akaydin, G., Yesilada, E., and Tasdemir, D. (2016). Evaluation of *in vitro* antiprotozoal activity of *Ajuga laxmannii* and its secondary metabolites. *Pharm Biol* 54, 1808–1814.

Auffret, G., Labaied, M., Frappier, F., Rasoanaivo, P., Grellier, P., and Lewin, G. (2007). Synthesis and antimalarial evaluation of a series of piperaziny flavones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17, 959–963.

Azebaze, A.G.B., Dongmo, A.B., Meyer, M., Ouahou, B.M.W., Valentin, A., Laure Nguemfo, E., Nkengfack, A.E., and Vierling, W. (2007). Antimalarial and vasorelaxant constituents of the leaves of *Allanblackia monticola* (Guttiferae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 101, 23–30.

Azebaze, A.G.B., Teinkela, J.E.M., Nguemfo, E.L., Valentin, A., Dongmo, A.B., and Vardamides, J.C. (2015). Antiplasmodial activity of some phenolic compounds from Cameroonians *Allanblackia*. *Afr Health Sci* 15, 835–840.

Barber, B.E., Rajahram, G.S., Grigg, M.J., William, T., and Anstey, N.M. (2017). World Malaria Report: time to acknowledge *Plasmodium knowlesi* malaria. *Malaria Journal* 16.

van Baren, C., Anao, I., Leo Di Lira, P., Debenedetti, S., Houghton, P., Croft, S., and Martino, V. (2006). Triterpenic acids and flavonoids from *Satureja parvifolia*. Evaluation of their antiprotozoal activity. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 61, 189–192.

Baumgärtner, F., Jourdan, J., Scheurer, C., Blasco, B., Campo, B., Mäser, P., and Wittlin, S. (2017). *In vitro* activity of anti-malarial ozonides against an artemisinin-resistant isolate. *Malar. J.* 16, 45.

- Beeson, J.G., Winstanley, P.A., McFadden, G.I., and Brown, G.V. (2001). New agents to combat malaria. *Nat. Med.* 7, 149–150.
- Biamonte, M.A., Wanner, J., and Le Roch, K.G. (2013). Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 2829–2843.
- Biot, C., Botté, C.Y., Dubar, F., and Maréchal, É. (2012). Paludisme: Recherche de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'apicoplaste, un organelle cellulaire d'origine algale. *Médecine/sciences* 28, 163–171.
- Bourjot, M., Apel, C., Martin, M.-T., Grellier, P., Nguyen, V., Guéritte, F., and Litaudon, M. (2010). Antiplasmodial, Antitrypanosomal, and Cytotoxic Activities of Prenylated Flavonoids Isolated from the Stem Bark of *Artocarpus styracifolius*. *Planta Medica* 76, 1600–1604.
- Boyle, M.J., Richards, J.S., Gilson, P.R., Chai, W., and Beeson, J.G. (2010). Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood* 115, 4559–4568.
- Bray, P.G., Mungthin, M., Ridley, R.G., and Ward, S.A. (1998). Access to hematin: the basis of chloroquine resistance. *Mol. Pharmacol.* 54, 170–179.
- Bringmann, G., Ochse, M., Zotz, G., Peters, K., Peters, E.-M., Brun, R., and Schlauer, J. (2000). 6-Hydroxyluteolin-7-O-(1''- α -rhamnoside) from *Vriesea sanguinolenta* Cogn. and Marchal (Bromeliaceae). *Phytochemistry* 53, 965–969.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales* (Paris, Technique et Documentation, Lavoisier).
- Cao, G., Sofic, E., and Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749–760.
- Casano, G., Dumètre, A., Pannecouque, C., Hutter, S., Azas, N., and Robin, M. (2010). Anti-HIV and antiplasmodial activity of original flavonoid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18, 6012–6023.
- Charman, S.A., Arbe-Barnes, S., Bathurst, I.C., Brun, R., Campbell, M., Charman, W.N., Chiu, F.C.K., Chollet, J., Craft, J.C., Creek, D.J., *et al.* (2011). Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4400–4405.
- Cheema, H.S., Prakash, O., Pal, A., Khan, F., Bawankule, D.U., and Darokar, M.P. (2014). Glabridin induces oxidative stress mediated apoptosis like cell death of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology International* 63, 349–358.
- Chen, N., LaCrue, A.N., Teuscher, F., Waters, N.C., Gatton, M.L., Kyle, D.E., and Cheng, Q. (2014). Fatty acid synthesis and pyruvate metabolism pathways remain active in dihydroartemisinin-induced dormant ring stages of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4773–4781.
- Chowdhry, V., Bisoyi, S., and Mishra, B. (2012). Perioperative challenges in a patient of severe G6PD deficiency undergoing open heart surgery. *Ann Card Anaesth* 15, 50–53.
- Chukwujekwu, J.C., de Kock, C.A., Smith, P.J., van Heerden, F.R., and van Staden, J. (2012). Antiplasmodial and antibacterial activity of compounds isolated from *Ormocarpum trichocarpum*. *Planta Med.* 78, 1857–1860.

- Clavin, M., Cazorla, S., Spina, R., Sosa, M.A., Malchiodi, E.L., Martino, V., Frank, F.M., and Muschietti, L.V. (2016). Antiprotozoal activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal of Parasitic Diseases: Diagnosis and Therapy 1*.
- Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J.R., Bennett, B.L., Lawrence, R., Esko, J.D., Billker, O., and Sinnis, P. (2007). Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microbe 2*, 316–327.
- Crosnier, C., Bustamante, L.Y., Bartholdson, S.J., Bei, A.K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D.P., Duraisingh, M.T., *et al.* (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature 480*, 534–537.
- Cunha-Rodrigues, M., Portugal, S., Prudêncio, M., Gonçalves, L.A., Casalou, C., Bugar, D., Sauerwein, R., Haas, W., and Mota, M.M. (2008). Genistein-Supplemented Diet Decreases Malaria Liver Infection in Mice and Constitutes a Potential Prophylactic Strategy. *PLoS ONE 3*, e2732.
- Davis, T.M.E., Hung, T.-Y., Sim, I.-K., Karunajeewa, H.A., and Ilett, K.F. (2005). Piperaquine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs 65*, 75–87.
- De, D., Krogstad, F.M., Cogswell, F.B., and Krogstad, D.J. (1996). Aminoquinolines that circumvent resistance in *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg. 55*, 579–583.
- Deharo, E., García, R.N., Oporto, P., Gimenez, A., Sauvain, M., Jullian, V., and Ginsburg, H. (2002). A non-radiolabelled ferriprotoporphyrin IX biomineralisation inhibition test for the high throughput screening of antimalarial compounds. *Exp. Parasitol. 100*, 252–256.
- Deponte, M. (2008). Programmed cell death in protists. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1783*, 1396–1405.
- Dhooghe, L., Maregesi, S., Mincheva, I., Ferreira, D., Marais, J.P.J., Lemièrre, F., Matheussen, A., Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A., *et al.* (2010). Antiplasmodial activity of (I-3,II-3)-biflavonoids and other constituents from *Ormocarpum kirkii*. *Phytochemistry 71*, 785–791.
- van Dooren, G.G., Stimmler, L.M., and McFadden, G.I. (2006). Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion. *FEMS Microbiology Reviews 30*, 596–630.
- Dubar, F., Khalife, J., Brocard, J., Dive, D., and Biot, C. (2008). Ferroquine, an ingenious antimalarial drug: thoughts on the mechanism of action. *Molecules 13*, 2900–2907.
- Duru, V., Khim, N., Leang, R., Kim, S., Domergue, A., Kloeung, N., Ke, S., Chy, S., Eam, R., Khean, C., *et al.* (2015). *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperaquine *in vitro* assays: retrospective and prospective investigations. *BMC Medicine 13*.
- Ecker, A., Lehane, A.M., and Fidock, D.A. (2011). Molecular Markers of *Plasmodium* Resistance to Antimalarials. In *Treatment and Prevention of Malaria*, H.M. Staines, and S. Krishna, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 249–280.
- Eholié, S.P., Bissagnéné, E., and Girard, P.-M. (2008). *Mémento thérapeutique du paludisme en Afrique* (Paris; Rueil-Malmaison: Institut de médecine et d'épidémiologie appliquée ; Doin).
- Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.B., Naudé, B., Deitsch, K.W., *et al.* (2000). Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell 6*, 861–871.

- Fonseca-Silva, F., Canto-Cavalheiro, M.M., Menna-Barreto, R.F.S., and Almeida-Amaral, E.E. (2015). Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Natural Products*, 78, 880–884.
- Frölich, S., Schubert, C., Bienzle, U., and Jenett-Siems, K. (2005). *In vitro* antiplasmodial activity of prenylated chalcone derivatives of hops (*Humulus lupulus*) and their interaction with haemin. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 883–887.
- Fulda, S., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 447–464.
- Gadetskaya, A.V., Tarawneh, A.H., Zhusupova, G.E., Gemejiyeva, N.G., Cantrell, C.L., Cutler, S.J., and Ross, S.A. (2015). Sulfated phenolic compounds from *Limonium caspium*: Isolation, structural elucidation, and biological evaluation. *Fitoterapia* 104, 80–85.
- Ganesh, D., Fuehrer, H.-P., Starzengrüber, P., Swoboda, P., Khan, W.A., Reismann, J.A.B., Mueller, M.S.K., Chiba, P., and Noedl, H. (2012). Antiplasmodial activity of flavonol quercetin and its analogues in *Plasmodium falciparum*: evidence from clinical isolates in Bangladesh and standardized parasite clones. *Parasitol. Res.* 110, 2289–2295.
- Gentilini, M. (2012). *Médecine Tropicale (Lavoisier)*.
- Gerald, N., Mahajan, B., and Kumar, S. (2011). Mitosis in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell* 10, 474–482.
- Gil, E.S., and Cout, R.O. (2013). Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23, 542–558.
- Go, M.-L., Liu, M., Wilairat, P., Rosenthal, P.J., Saliba, K.J., and Kirk, K. (2004). Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol-induced hemolysis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3241–3245.
- Goodman, C.D., Buchanan, H.D., and McFadden, G.I. (2017). Is the Mitochondrion a Good Malaria Drug Target? *Trends in Parasitology* 33, 185–193.
- Griffiths, L.A., and Smith, G.E. (1972). Metabolism of myricetin and related compounds in the rat. Metabolite formation *in vivo* and by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. J.* 130, 141–151.
- Guimarães, A.M., Lima, J.D., and Ribeiro, M.F.B. (2003). Ultrastructure of *Babesia equi* trophozoites isolated in Minas Gerais, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 23.
- Gupta, A.K., Saxena, S., and Saxena, M. (2010). Integrated ligand and structure based studies of flavonoids as fatty acid biosynthesis inhibitors of *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 4779–4781.
- Ha, Y.R., Kang, Y.-J., and Lee, S.J. (2015). *In vivo* study on splenomegaly inhibition by genistein in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Parasitol. Int.* 64, 369–376.
- Hegge, S., Münter, S., Steinbüchel, M., Heiss, K., Engel, U., Matuschewski, K., and Frischknecht, F. (2010). Multistep adhesion of *Plasmodium* sporozoites. *FASEB J.* 24, 2222–2234.
- Held, J., Supan, C., Salazar, C.L.O., Tinto, H., Bonkian, L.N., Nahum, A., Moulero, B., Sié, A., Coulibaly, B., Sirima, S.B., *et al.* (2015). Ferroquine and artesunate in African adults and children with *Plasmodium falciparum* malaria: a phase 2, multicentre, randomised, double-blind, dose-ranging, non-inferiority study. *Lancet Infect Dis* 15, 1409–1419.

- Helgren, T.R., Sciotti, R.J., Lee, P., Duffy, S., Avery, V.M., Igbino, O., Akoto, M., and Hagen, T.J. (2015). The synthesis, antimalarial activity and CoMFA analysis of novel aminoalkylated quercetin analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25, 327–332.
- Holmgren, G., Gil, J.P., Ferreira, P.M., Veiga, M.I., Obonyo, C.O., and Björkman, A. (2006). Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria *in vivo* is associated with selection of *pfprt* 76T and *pfmdr1* 86Y. *Infection, Genetics and Evolution* 6, 309–314.
- Holmgren, G., Hamrin, J., Svärd, J., Mårtensson, A., Gil, J.P., and Björkman, A. (2007). Selection of *pfmdr1* mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa. *Infection, Genetics and Evolution* 7, 562–569.
- Hoppe, H.C., van Schalkwyk, D.A., Wiehart, U.I.M., Meredith, S.A., Egan, J., and Weber, B.W. (2004). Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2370–2378.
- Houël, E., Nardella, F., Jullian, V., Valentin, A., Vonthron-Sénécheau, C., Villa, P., Obrecht, A., Kaiser, M., Bourreau, E., Odonne, G., *et al.* (2016). Wayanin and guaijaverin, two active metabolites found in a *Psidium acutangulum* Mart. ex DC (syn. *P. persoonii* McVaugh) (Myrtaceae) antimalarial decoction from the Wayana Amerindians. *J Ethnopharmacol* 187, 241–248.
- Ichino, C., Kiyohara, H., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W., Ishiyama, A., Sekiguchi, H., Namatame, M., Otaguro, K., Omura, S., and Yamada, H. (2006). Antimalarial Activity of Biflavonoids from *Ochna integerrima*. *Planta Medica* 72, 611–614.
- Ijaz, F., Ahmad, N., Ahmad, I., ul Haq, A., and Wang, F. (2010). Two new anti-plasmodial flavonoid glycosides from *Duranta repens*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 25, 773–778.
- Jiménez-Díaz, M.B., Ebert, D., Salinas, Y., Pradhan, A., Lehane, A.M., Myrand-Lapierre, M.-E., O’Loughlin, K.G., Shackelford, D.M., Justino de Almeida, M., Carrillo, A.K., *et al.* (2014). (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E5455-5462.
- Jin, H., Xu, Z., Cui, K., Zhang, T., Lu, W., and Huang, J. (2014). Dietary flavonoids fisetin and myricetin: dual inhibitors of *Plasmodium falciparum* falcipain-2 and plasmepsin II. *Fitoterapia* 94, 55–61.
- Juma, W.P., Akala, H.M., Eyase, F.L., Muiva, L.M., Heydenreich, M., Okalebo, F.A., Gitu, P.M., Peter, M.G., Walsh, D.S., Imbuga, M., *et al.* (2011). Terpurinflavone: An antiplasmodial flavone from the stem of *Tephrosia Purpurea*. *Phytochemistry Letters* 4, 176–178.
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Nambuddee, K., and Kongsaree, P. (2004). New Bioactive Prenylflavonoids and Dibenzocycloheptene Derivative from Roots of *Dendrobium lanceolatum*. *J. Nat. Prod.* 67, 968–972.
- Kant, R., Kumar, D., Agarwal, D., Gupta, R.D., Tilak, R., Awasthi, S.K., and Agarwal, A. (2016). Synthesis of newer 1,2,3-triazole linked chalcone and flavone hybrid compounds and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activities. *Eur J Med Chem* 113, 34–49.
- Karunajeewa, H.A. (2011). Artemisinins: Artemisinin, Dihydroartemisinin, Artemether and Artesunate. In *Treatment and Prevention of Malaria*, H.M. Staines, and S. Krishna, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 157–190.
- Kerubo, L.O., Midiwo, J.O., Derese, S., Langat, M.K., Akala, H.M., Waters, N.C., Peter, M., and Heydenreich, M. (2013). Antiplasmodial activity of compounds from the surface exudates of *Senecio roseiflorus*. *Nat Prod Commun* 8, 175–176.

- Khaomek, P., Ichino, C., Ishiyama, A., Sekiguchi, H., Namatame, M., Ruangrunsi, N., Saifah, E., Kiyohara, H., Otaguro, K., Omura, S., *et al.* (2008). *In vitro* antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. *J Nat Med* 62, 217–220.
- Kim, Y.C., Kim, H.-S., Wataya, Y., Sohn, D.H., Kang, T.H., Kim, M.S., Kim, Y.M., Lee, G.-M., Chang, J.-D., and Park, H. (2004). Antimalarial activity of lavandulyl flavanones isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 748–750.
- Kimata-Arigo, Y., Kurisu, G., Kusunoki, M., Aoki, S., Sato, D., Kobayashi, T., Kita, K., Horii, T., and Hase, T. (2007). Cloning and characterization of ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase from human malaria parasite. *J. Biochem.* 141, 421–428.
- Klonis, N., Xie, S.C., McCaw, J.M., Crespo-Ortiz, M.P., Zaloumis, S.G., Simpson, J.A., and Tilley, L. (2013). Altered temporal response of malaria parasites determines differential sensitivity to artemisinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 5157–5162.
- Koch, M., and Baum, J. (2016). The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. *Cell. Microbiol.* 18, 319–329.
- Konziase, B. (2015). Protective activity of biflavanones from *Garcinia kola* against *Plasmodium* infection. *J Ethnopharmacol* 172, 214–218.
- Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Gupta, M.P., Bienzle, U., and Eich, E. (2000). Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 131–135.
- Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Jakupovic, J., Mavi, S., Bienzle, U., and Eich, E. (2003). *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytotherapy Research* 17, 123–128.
- Krishna, S., and Staines, H.M. (2011). Non-Antifolate Antibiotics: Clindamycin, Doxycycline, Azithromycin and Fosmidomycin. In *Treatment and Prevention of Malaria*, H.M. Staines, and S. Krishna, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 141–156.
- Kuhen, K.L., Chatterjee, A.K., Rottmann, M., Gagaring, K., Borboa, R., Buenviaje, J., Chen, Z., Francek, C., Wu, T., Nagle, A., *et al.* (2014). KAF156 Is an Antimalarial Clinical Candidate with Potential for Use in Prophylaxis, Treatment, and Prevention of Disease Transmission. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5060–5067.
- Leang, R., Taylor, W.R.J., Bouth, D.M., Song, L., Tarning, J., Char, M.C., Kim, S., Witkowski, B., Duru, V., Domergue, A., *et al.* (2015). Evidence of *falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- Leang, R., Canavati, S.E., Khim, N., Vestergaard, L.S., Borghini Fuhrer, I., Kim, S., Denis, M.B., Heng, P., Tol, B., Huy, R., *et al.* (2016). Efficacy and safety of pyronaridine-artesunate for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in western Cambodia. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- Lehane, A.M., Ridgway, M.C., Baker, E., and Kirk, K. (2014). Diverse chemotypes disrupt ion homeostasis in the malaria parasite: Diverse chemotypes disrupt *Plasmodium* ion regulation. *Molecular Microbiology* 94, 327–339.
- Lenta, B.N., Tantangmo, F., Devkota, K.P., Wansi, J.D., Chouna, J.R., Soh, R.C.F., Neumann, B., Stammler, H.-G., Tsamo, E., and Sewald, N. (2009). Bioactive Constituents of the Stem Bark of *Beilschmiedia zenkeri*. *J. Nat. Prod.* 72, 2130–2134.

- Lim, L., and McFadden, G.I. (2010). The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 749–763.
- Liu, M., Wilairat, P., and Go, M.-L. (2001). Antimalarial Alkoxyated and Hydroxylated Chalcones: Structure–Activity Relationship Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* 44, 4443–4452.
- Mauritz, J.M.A., Esposito, A., Ginsburg, H., Kaminski, C.F., Tiffert, T., and Lew, V.L. (2009). The homeostasis of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000339.
- Mbwambo, Z.H., Kapingu, M.C., Moshi, M.J., Machumi, F., Apers, S., Cos, P., Ferreira, D., Marais, J.P.J., Vanden Berghe, D., Maes, L., *et al.* (2006). Antiparasitic Activity of Some Xanthones and Biflavonoids from the Root Bark of *Garcinia livingstonei*. *J. Nat. Prod.* 69, 369–372.
- Meister, S., Plouffe, D.M., Kuhen, K.L., Bonamy, G.M.C., Wu, T., Barnes, S.W., Bopp, S.E., Borboa, R., Bright, A.T., Che, J., *et al.* (2011). Imaging of *Plasmodium* Liver Stages to Drive Next-Generation Antimalarial Drug Discovery. *Science* 334, 1372–1377.
- Ménard, D., Barnadas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L.R., Ratsimbao, A., Thonier, V., Carod, J.-F., Domarle, O., Colin, Y., *et al.* (2010). *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5967–5971.
- Mi-Ichi, F. (2005). Parasite Mitochondria as a Target of Chemotherapy: Inhibitory Effect of Licochalcone A on the *Plasmodium falciparum* Respiratory Chain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1056, 46–54.
- Monbrison, F. de, Maitrejean, M., Latour, C., Bugnazet, F., Peyron, F., Barron, D., and Picot, S. (2006). *In vitro* antimalarial activity of flavonoid derivatives dehydrosilybin and 8-(1;1)-DMA-kaempferide. *Acta Tropica* 97, 102–107.
- Montenegro, H., González, J., Ortega-Barria, E., and Cubilla-Rios, L. (2007). Antiprotozoal Activity of Flavonoid Glycosides Isolated from *Clidemia sericea* and *Mosquitoxylon jamaicense*. *Pharmaceutical Biology* 45, 376–380.
- Muhammad, A., Anis, I., Ali, Z., Awadelkarim, S., Khan, A., Khalid, A., Shah, M.R., Galal, M., Khan, I.A., and Iqbal Choudhary, M. (2012). Methylenebissantin: A rare methylene-bridged bisflavonoid from *Dodonaea viscosa* which inhibits *Plasmodium falciparum* enoyl-ACP reductase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 610–612.
- Mzayek, F., Deng, H., Mather, F.J., Wasilevich, E.C., Liu, H., Hadi, C.M., Chansolme, D.H., Murphy, H.A., Melek, B.H., Tenaglia, A.N., *et al.* (2007). Randomized dose-ranging controlled trial of AQ-13, a candidate antimalarial, and chloroquine in healthy volunteers. *PLoS Clin Trials* 2, e6.
- Ngamga, D., Yankep, E., Tane, P., Bezabih, M., Ngadjui, B.T., Fomum, Z.T., and Abegaz, B.M. (2005). Antiparasitic prenylated isoflavonoids from seeds of *Millettia griffoniana*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* 19, 75–80.
- Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B.L., Socheat, D., Fukuda, M.M., and Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium (2008). Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N. Engl. J. Med.* 359, 2619–2620.
- Nunome, S., Ishiyama, A., Kobayashi, M., Otaguro, K., Kiyohara, H., Yamada, H., and Omura, S. (2004). *In vitro* antimalarial activity of biflavonoids from *Wikstroemia indica*. *Planta Med.* 70, 76–78.
- Nzila, A. (2011). Antifolates: Pyrimethamine, Proguanil, Sulphadoxine and Dapsone. In *Treatment and Prevention of Malaria*, H.M. Staines, and S. Krishna, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 113–125.

- Omara-Opyene, A.L., Moura, P.A., Sulsona, C.R., Bonilla, J.A., Yowell, C.A., Fujioka, H., Fidock, D.A., and Dame, J.B. (2004). Genetic Disruption of the *Plasmodium falciparum* Digestive Vacuole Plasmepsins Demonstrates Their Functional Redundancy. *Journal of Biological Chemistry* 279, 54088–54096.
- O’Neill, P.M., Bray, P.G., Hawley, S.R., Ward, S.A., and Park, B.K. (1998). 4-Aminoquinolines--past, present, and future: a chemical perspective. *Pharmacol. Ther.* 77, 29–58.
- O’Neill, P.M., Barton, V.E., Ward, S.A., and Chadwick, J. (2011). 4-Aminoquinolines: Chloroquine, Amodiaquine and Next-Generation Analogues. In *Treatment and Prevention of Malaria*, H.M. Staines, and S. Krishna, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 19–44.
- OMS (2000). Severe *falciparum* malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94 Suppl 1, S1-90.
- Organisation mondiale de la santé (2013). *La prise en charge du paludisme grave guide pratique* (Genève: OMS).
- Organisation mondiale de la santé (2015). *Guidelines for the treatment of malaria* (Geneva: World Health Organization).
- Ortet, R., Prado, S., Regalado, E.L., Valeriote, F.A., Media, J., Mendiola, J., and Thomas, O.P. (2011). Furfuran lignans and a flavone from *Artemisia gorgonum* Webb and their *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum*. *Journal of Ethnopharmacology* 138, 637–640.
- Paul, A.S., Egan, E.S., and Duraisingh, M.T. (2015). Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. *Curr. Opin. Hematol.* 22, 220–226.
- Phillips, M.A., and Rathod, P.K. (2010). *Plasmodium* dihydroorotate dehydrogenase: a promising target for novel anti-malarial chemotherapy. *Infect Disord Drug Targets* 10, 226–239.
- Phyo, A.P., Jittamala, P., Nosten, F.H., Pukrittayakamee, S., Imwong, M., White, N.J., Duparc, S., Macintyre, F., Baker, M., and Möhrle, J.J. (2016). Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: an open-label phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* 16, 61–69.
- Poirier, P., Doderer-Lang, C., Atchade, P.S., Lemoine, J.-P., de l’Isle, M.-L.C., Abou-bacar, A., Pfaff, A.W., Brunet, J., Arnoux, L., Haar, E., *et al.* (2016). The hide and seek of *Plasmodium vivax* in West Africa: report from a large-scale study in Beninese asymptomatic subjects. *Malaria Journal* 15.
- Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., Sauvain, M., Valentin, A., and Moulis, C. (2007). Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry* 68, 1312–1320.
- Price, R.N., Uhlemann, A.-C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N.J., *et al.* (2004). Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* 364, 438–447.
- Price, R.N., Uhlemann, A.-C., van Vugt, M., Brockman, A., Hutagalung, R., Nair, S., Nash, D., Singhasivanon, P., Anderson, T.J.C., Krishna, S., *et al.* (2006). Molecular and Pharmacological Determinants of the Therapeutic Response to Artemether-Lumefantrine in Multidrug-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *Clinical Infectious Diseases* 42, 1570–1577.
- Prudêncio, M., Rodriguez, A., and Mota, M.M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews Microbiology* 4, 849–856.

- Ramanandraibe, V., Grellier, P., Martin, M.-T., Deville, A., Joyeau, R., Ramanitrahasimbola, D., Mouray, E., Rasoanaivo, P., and Mambu, L. (2008). Antiplasmodial Phenolic compounds from *Piptadenia pervillei*. *Planta Medica* *74*, 417–421.
- del Rayo Camacho, M., Phillipson, J.D., Croft, S.L., Marley, D., Kirby, G.C., and Warhurst, D.C. (2002). Assessment of the Antiprotozoal Activity of *Galphimia glauca* and the Isolation of New Norsecofriedelanes and Nor-friedelanes. *J. Nat. Prod.* *65*, 1457–1461.
- Ridley, R.G., Hofheinz, W., Matile, H., Jaquet, C., Dorn, A., Masciadri, R., Jolidon, S., Richter, W.F., Guenzi, A., Girometta, M.A., *et al.* (1996). 4-aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *40*, 1846–1854.
- Rodrigues, T., Ressurreição, A.S., da Cruz, F.P., Albuquerque, I.S., Gut, J., Carrasco, M.P., Gonçalves, D., Guedes, R.C., dos Santos, D.J.V.A., Mota, M.M., *et al.* (2013). Flavones as isosteres of 4(1H)-quinolones: discovery of ligand efficient and dual stage antimalarial lead compounds. *Eur J Med Chem* *69*, 872–880.
- Rueangweerayut, R., Phyto, A.P., Uthaisin, C., Poravuth, Y., Binh, T.Q., Tinto, H., Pénali, L.K., Valecha, N., Tien, N.T., Abdulla, S., *et al.* (2012). Pyronaridine-artesunate versus mefloquine plus artesunate for malaria. *N. Engl. J. Med.* *366*, 1298–1309.
- Rukachaisirikul, T., Innok, P., and Suksamrarn, A. (2008). *Erythrina* Alkaloids and a Pterocarpan from the Bark of *Erythrina subumbrans*. *J. Nat. Prod.* *71*, 156–158.
- Sakaguchi, M., Miyazaki, N., Fujioka, H., Kaneko, O., and Murata, K. (2016). Three-dimensional analysis of morphological changes in the malaria parasite infected red blood cell by serial block-face scanning electron microscopy. *Journal of Structural Biology* *193*, 162–171.
- Salvi, M., Brunati, A.M., Clari, G., and Toninello, A. (2002). Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* *1556*, 187–196.
- van Schaijk, B.C.L., Kumar, T.R.S., Vos, M.W., Richman, A., van Gemert, G.-J., Li, T., Eappen, A.G., Williamson, K.C., Morahan, B.J., Fishbaugher, M., *et al.* (2014). Type II fatty acid biosynthesis is essential for *Plasmodium falciparum* sporozoite development in the midgut of *Anopheles mosquitoes*. *Eukaryotic Cell* *13*, 550–559.
- Seeber, F., Aliverti, A., and Zanetti, G. (2005). The plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductase/ferredoxin redox system as a possible drug target against apicomplexan human parasites. *Curr. Pharm. Des.* *11*, 3159–3172.
- Semenov, A., Olson, J.E., and Rosenthal, P.J. (1998). Antimalarial synergy of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 2254–2258.
- Sharma, N., Mohanakrishnan, D., Shard, A., Sharma, A., Saima, Sinha, A.K., and Sahal, D. (2012). Stilbene–Chalcone Hybrids: Design, Synthesis, and Evaluation as a New Class of Antimalarial Scaffolds That Trigger Cell Death through Stage Specific Apoptosis. *Journal of Medicinal Chemistry* *55*, 297–311.
- Shears, M.J., Botté, C.Y., and McFadden, G.I. (2015). Fatty acid metabolism in the *Plasmodium* apicoplast: Drugs, doubts and knockouts. *Molecular and Biochemical Parasitology* *199*, 34–50.
- Sidhu, A.B.S., Verdier-Pinard, D., and Fidock, D.A. (2002). Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr* mutations. *Science* *298*, 210–213.

- Silfen, J., Yanai, P., and Cabantchik, Z.I. (1988). Bioflavonoid effects on *in vitro* cultures of *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology* 37, 4269–4276.
- Sisodia, B.S., Negi, A.S., Darokar, M.P., Dwivedi, U.N., and Khanuja, S.P.S. (2012). Antiplasmodial activity of steroidal chalcones: evaluation of their effect on hemozoin synthesis and the new permeation pathway of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte membrane: Antiplasmodial activity of steroidal chalcones. *Chemical Biology & Drug Design* 79, 610–615.
- Skinner-Adams, T.S., Stack, C.M., Trenholme, K.R., Brown, C.L., Grembecka, J., Lowther, J., Mucha, A., Drag, M., Kafarski, P., McGowan, S., *et al.* (2010). *Plasmodium falciparum* neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 53–61.
- Songsiang, U., Wanich, S., Pitchuanom, S., Netsopa, S., Uanporn, K., and Yenjai, C. (2009). Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. *Fitoterapia* 80, 427–431.
- Soon Sung Lim, Hye-Sook Kim, and Dong-Ung Lee (2007). *In vitro* Antimalarial Activity of Flavonoids and Chalcones. *Bull. Korean Chem. Soc.* 28, 2495–2497.
- Spillman, N.J., and Kirk, K. (2015). The malaria parasite cation ATPase *PfATP4* and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 5, 149–162.
- Spillman, N.J., Allen, R.J.W., McNamara, C.W., Yeung, B.K.S., Winzeler, E.A., Diagona, T.T., and Kirk, K. (2013). Na⁺ Regulation in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Involves the Cation ATPase *PfATP4* and Is a Target of the Spiroindolone Antimalarials. *Cell Host & Microbe* 13, 227–237.
- Srivastava, S., Joshi, S., Singh, A.R., Yadav, S., Saxena, A.S., Ram, V.J., Chandra, S., and Saxena, J.K. (2008). Oxygenated chalcones and bischalcones as a new class of inhibitors of DNA topoisomerase II of malarial parasites. *Medicinal Chemistry Research* 17, 234–244.
- Stickles, A.M., de Almeida, M.J., Morrissey, J.M., Sheridan, K.A., Forquer, I.P., Nilsen, A., Winter, R.W., Burrows, J.N., Fidock, D.A., Vaidya, A.B., *et al.* (2015). Subtle changes in endochin-like quinolone structure alter the site of inhibition within the cytochrome bc1 complex of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1977–1982.
- Straimer, J., Gnädig, N.F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Duru, V., Ramadani, A.P., Dacheux, M., Khim, N., Zhang, L., Lam, S., *et al.* (2015). Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* 347, 428–431.
- Subeki, Matsuura, H., Takahashi, K., Yamasaki, M., Yamato, O., Maede, Y., Katakura, K., Kobayashi, S., Trimurningsih, Chairul, *et al.* (2005). Anti-babesial and Anti-plasmodial Compounds from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 68, 537–539.
- Sullivan, D.J. (2011). Cinchona Alkaloids: Quinine and Quinidine. In *Treatment and Prevention of Malaria*, H.M. Staines, and S. Krishna, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 45–68.
- Sulyok, M., Rückle, T., Roth, A., Mürbeth, R.E., Chalon, S., Kerr, N., Samec, S.S., Gobeau, N., Calle, C.L., Ibáñez, J., *et al.* (2017). DSM265 for *Plasmodium falciparum* chemoprophylaxis: a randomised, double blinded, phase 1 trial with controlled human malaria infection. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Supan, C., Mombo-Ngoma, G., Dal-Bianco, M.P., Ospina Salazar, C.L., Issifou, S., Mazuir, F., Filali-Ansary, A., Biot, C., Ter-Minassian, D., Ramharther, M., *et al.* (2012). Pharmacokinetics of Ferroquine, a Novel 4-Aminoquinoline, in Asymptomatic Carriers of *Plasmodium falciparum* Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 3165–3173.

- Surat Boonphong, Apiwat Baramée, Prasat Kittakoop, and Pakawan Puangsombat (2007). Antitubercular and Antiplasmodial Prenylated Flavones from the Roots of *Artocarpus altilis*. *Journal of Science* 34, 339–344.
- Sutherland, C.J., Lansdell, P., Sanders, M., Muwanguzi, J., van Schalkwyk, D.A., Kaur, H., Nolder, D., Tucker, J., Bennett, H.M., Otto, T.D., *et al.* (2017). *pfk13*-Independent Treatment Failure in Four Imported Cases of *Plasmodium falciparum* Malaria Treated with Artemether-Lumefantrine in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61.
- Suwito, H., Jumina, null, Mustofa, null, Pudjiastuti, P., Fanani, M.Z., Kimata-Ariga, Y., Katahira, R., Kawakami, T., Fujiwara, T., Hase, T., *et al.* (2014). Design and synthesis of chalcone derivatives as inhibitors of the ferredoxin - ferredoxin-NADP⁺ reductase interaction of *Plasmodium falciparum*: pursuing new antimalarial agents. *Molecules* 19, 21473–21488.
- Szumilas, M. (2010). Explaining odds ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 19, 227–229.
- Tasdemir, D., Lack, G., Brun, R., Rüedi, P., Scapozza, L., and Perozzo, R. (2006). Inhibition of *Plasmodium falciparum* Fatty Acid Biosynthesis: Evaluation of FabG, FabZ, and FabI as Drug Targets for Flavonoids. *J. Med. Chem.* 49, 3345–3353.
- Tilley, L., Straimer, J., Gnädig, N.F., Ralph, S.A., and Fidock, D.A. (2016). Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology* 32, 682–696.
- Torres-Mendoza, D., González, J., Ortega-Barría, E., Heller, M.V., Capson, T.L., McPhail, K., Gerwick, W.H., and Cubilla-Rios, L. (2006). Weakly Antimalarial Flavonol Arabinofuranosides from *Calycolpus warszewiczianus*. *J. Nat. Prod.* 69, 826–828.
- Toure, O.A., Penali, L.K., Yapi, J.-D., Ako, B.A., Toure, W., Djerea, K., Gomez, G.O., and Makaila, O. (2009). A comparative, randomized clinical trial of artemisinin/naphtoquine twice daily one day versus artemether/lumefantrine six doses regimen in children and adults with uncomplicated *falciparum* malaria in Côte d’Ivoire. *Malar. J.* 8, 148.
- Tun, K.M., Imwong, M., Lwin, K.M., Win, A.A., Hlaing, T.M., Hlaing, T., Lin, K., Kyaw, M.P., Plewes, K., Faiz, M.A., *et al.* (2015). Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Upegui, Y., Gil, J.F., Quiñones, W., Torres, F., Escobar, G., Robledo, S.M., and Echeverri, F. (2014). Preparation of rotenone derivatives and *in vitro* analysis of their antimalarial, antileishmanial and selective cytotoxic activities. *Molecules* 19, 18911–18922.
- Vaidya, A.B. (2011). Naphthoquinones: Atovaquone, and Other Antimalarials Targeting Mitochondrial Functions. In *Treatment and Prevention of Malaria*, H.M. Staines, and S. Krishna, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 127–139.
- Vaidya, A.B., Morrisey, J.M., Zhang, Z., Das, S., Daly, T.M., Otto, T.D., Spillman, N.J., Wyvratt, M., Siegl, P., Marfurt, J., *et al.* (2014). Pyrazoleamide compounds are potent antimalarials that target Na⁺ homeostasis in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications* 5, 5521.
- Waters, N.C., and Edstein, M.D. (2011). 8-Aminoquinolines: Primaquine and Tafenoquine. In *Treatment and Prevention of Malaria*, H.M. Staines, and S. Krishna, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 69–94.
- Wells, T.N.C., Hooft van Huijsduijnen, R., and Van Voorhis, W.C. (2015). Malaria medicines: a glass half full? *Nat Rev Drug Discov* 14, 424–442.

- Weniger, B., Robledo, S., Arango, G.J., Deharo, E., Aragón, R., Muñoz, V., Callapa, J., Lobstein, A., and Anton, R. (2001). Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology* 78, 193–200.
- Weniger, B., Vonthron-Sénécheau, C., Arango, G.J., Kaiser, M., Brun, R., and Anton, R. (2004). A bioactive biflavonoid from *Camposperma panamense*. *Fitoterapia* 75, 764–767.
- Weniger, B., Vonthron-Sénécheau, C., Kaiser, M., Brun, R., and Anton, R. (2006). Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine* 13, 176–180.
- White, N.J. (2011). Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar. J.* 10, 297.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Hien, T.T., Faiz, M.A., Mokuolu, O.A., and Dondorp, A.M. (2014a). Malaria. *Lancet* 383, 723–735.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Phyto, A.P., Rueangweerayut, R., Nosten, F., Jittamala, P., Jeeyapant, A., Jain, J.P., Lefèvre, G., Li, R., *et al.* (2014b). Spiroindolone KAE609 for *Falciparum* and *Vivax* Malaria. *New England Journal of Medicine* 371, 403–410.
- White, N.J., Duong, T.T., Uthaisin, C., Nosten, F., Phyto, A.P., Hanboonkunupakarn, B., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chuthasmit, K., Cheung, M.S., *et al.* (2016). Antimalarial Activity of KAF156 in *Falciparum* and *Vivax* Malaria. *New England Journal of Medicine* 375, 1152–1160.
- Widyawaruyanti, A., Subehan, Kalauni, S.K., Awale, S., Nindatu, M., Zaini, N.C., Syafruddin, D., Asih, P.B.S., Tezuka, Y., and Kadota, S. (2007). New prenylated flavones from *Artocarpus champeden*, and their antimalarial activity *in vitro*. *J Nat Med* 61, 410–413.
- Witkowski, B., Amaratunga, C., Khim, N., Sreng, S., Chim, P., Kim, S., Lim, P., Mao, S., Sopha, C., Sam, B., *et al.* (2013). Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *in-vitro* and *ex-vivo* drug-response studies. *The Lancet Infectious Diseases* 13, 1043–1049.
- Witkowski, B., Duru, V., Khim, N., Ross, L.S., Saintpierre, B., Beghain, J., Chy, S., Kim, S., Ke, S., Kloeung, N., *et al.* (2016). A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype–genotype association study. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Yenesew, A., Akala, H.M., Twinomuhwezi, H., Chepkirui, C., Irungu, B.N., Eyase, F.L., Kamatenesi-Mugisha, M., Kiremire, B.T., Johnson, J.D., and Waters, N.C. (2012). The antiplasmodial and radical scavenging activities of flavonoids of *Erythrina burttii*. *Acta Tropica* 123, 123–127.
- Zakaria, I., Ahmat, N., Jaafar, F.M., and Widyawaruyanti, A. (2012). Flavonoids with antiplasmodial and cytotoxic activities of *Macaranga triloba*. *Fitoterapia* 83, 968–972.
- Zhang, G.-P., Xiao, Z.-Y., Rafique, J., Arfan, M., Smith, P.J., Lategan, C.A., and Hu, L.-H. (2009). Antiplasmodial Isoflavanones from the Roots of *Sophora mollis*. *J. Nat. Prod.* 72, 1265–1268.
- Ziegler, H.L., Hansen, H.S., Staerk, D., Christensen, S.B., Hagerstrand, H., and Jaroszewski, J.W. (2004). The Antiparasitic Compound Licochalcone A Is a Potent Echinocytogenic Agent That Modifies the Erythrocyte Membrane in the Concentration Range Where Antiplasmodial Activity Is Observed. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 4067–4071.

Chapitre 1

Propriétés pharmacologiques du composé tête-de-série MR27770

Propriétés pharmacologiques du composé tête-de-série MR27770

A . Introduction

Medicine for Malaria Venture (MMV), une structure de partenariat leader dans le développement de nouveaux antipaludiques (*Product Development Partnership*, PDP), a émis un certain nombre de recommandations concernant le profil idéal requis pour un nouveau candidat médicament contre le paludisme. Ces critères regroupent notamment les propriétés chimiques du composé chef-de-file, ses propriétés pharmacologiques, ses propriétés pharmacocinétiques et son activité antipaludique mesurée *in vivo*, ainsi que des éléments prédictifs de sa sécurité d'emploi. Ces critères sont plus ou moins précis en fonction de l'état d'avancement de la molécule dans le processus de développement d'un nouveau médicament : *hit* validé, *lead* initial, *lead* avancé, candidat préclinique. Différentes catégories ont été définies par MMV en fonction du profil d'action recherché du composé tête-de-série (**Figure 47**). Nous nous concentrerons dans cette partie sur les propriétés requises pour le développement d'un composé de type *Target Candidate Profile 1* (TCP1), c'est-à-dire ciblant le cycle érythrocytaire.

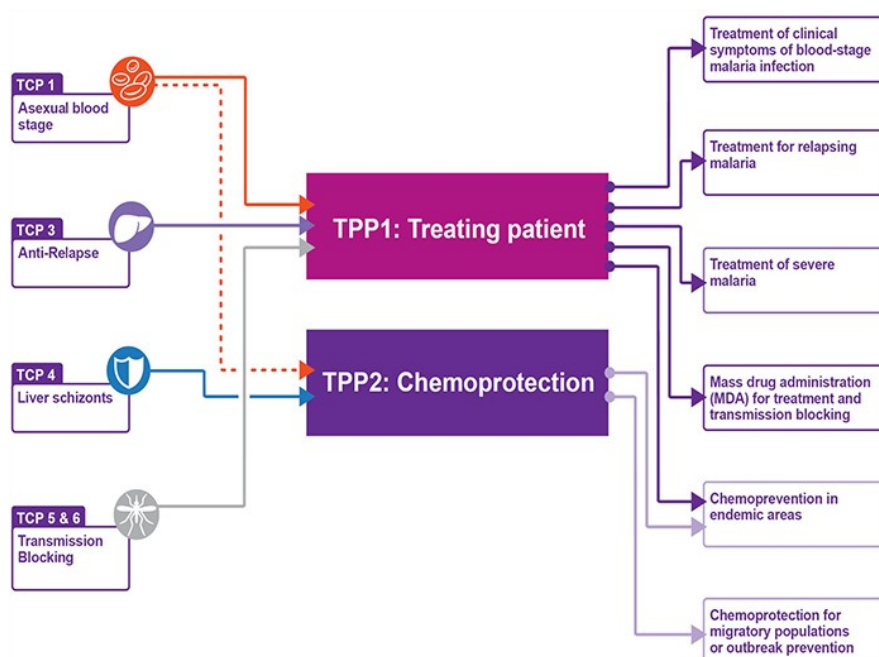


Figure 47. *Target candidate profiles* (TCPs) et *target product profiles* (TPPs) définis par MMV. TCP1 = molécules permettant de tuer les stades asexués sanguins, TCP3 = molécules ciblant les hypnozoïtes (anti-rechutes), TCP4 = molécules ciblant les schizontes hépatiques, TCP5 = molécules bloquant la transmission (ciblant les gamétocytes), TCP6 = molécules bloquant la transmission en ciblant l'insecte vecteur (endectocides). Les TPPs sont une combinaison de TCP visant à soigner le patient (TPP1) ou à prévenir la maladie (TPP2). D'après *mmv.org*

B . Cahier des charges d'un composé tête-de-série de type TCP1 selon les lignes directrices de MMV

1 . Propriétés chimiques

Les composés qui seront développés en tant que futurs médicaments antipaludiques doivent répondre à un certain nombre de caractéristiques chimiques. Dans un premier temps, la structure chimique doit être clairement caractérisée et le composé re-synthétisé afin de s'assurer de la viabilité du projet. Le composé doit ensuite répondre aux règles de Lipinsky — même si certaines exceptions dérogent à la règle — c'est-à-dire une masse moléculaire inférieure à 500 g/mol, un LogD à pH 7,4 inférieur à 5, un nombre de donneurs de liaison hydrogène inférieur à 5 et un nombre d'accepteurs de liaison hydrogène inférieur à 10 (Lipinski *et al.*, 1997). Ces critères contribuent à améliorer le passage transmembranaire des composés et leurs propriétés « *drug-like* ». MMV rajoute un critère supplémentaire qui est le nombre de centre stéréochimiques, qui doit être inférieur à trois (vraisemblablement pour simplifier la synthèse de ces composés, dont le coût doit être limité au maximum). Si un centre chiral est présent, celui-ci doit être clairement caractérisé (forme racémique ou non). Le schéma réactionnel doit être simple et comprendre peu d'étapes à partir de précurseurs disponibles commercialement. La solubilité dans une solution tampon de type PBS doit être supérieure à 10 µM et le composé doit être stable à pH 2 et pH 8 pour mimer le pH de l'estomac et de l'intestin, respectivement. Enfin, la structure du composé ne doit pas laisser présager d'un risque de génotoxicité. Dans un dernier temps, la nouveauté de la structure de la molécule et de la structure simplifiée doit être définie via une recherche sur la base de données SciFinder (répertoriant les structures chimiques décrites issues de publications et de brevets).

2 . Propriétés pharmacologiques

Ces propriétés varient en fonction de l'avancement de la série chimique, nous nous focaliserons sur les propriétés du *hit* validé dont la cible n'est pas connue, cas de figure rencontré pour notre composé tête-de-série MR27770. Le hit doit présenter une CI_{50} inférieure à 1 µM sur au moins deux souches distinctes de *P. falciparum* et présenter un indice de sélectivité supérieur à 10. La liaison du composé aux protéines plasmatiques doit être mesurée et les stades de développement érythrocytaires ciblés par le composé doivent être définis par microscopie. Le mécanisme d'action doit être nouveau et s'appuyer au minimum sur l'absence de résistance croisée avec les antipaludiques employés en thérapeutique, si la cible moléculaire n'est pas connue. Enfin, pour les séries plus avancées, la rapidité d'action du composé doit être déterminée (réduction de la charge parasitaire et temps nécessaire à l'induction de l'effet) ainsi que la concentration minimale parasiticide. Une sélection *in vitro* de mutants résistants au composé en développement doit également être réalisée pour les séries plus avancées dont les paramètres suivants doivent être déterminés : *inoculum* minimum pour induire une résistance, niveau d'activité minimal du composé vis-à-vis du mutant résistant obtenu, présence d'un marqueur moléculaire de résistance, impact sur la vitalité du parasite (*fitness cost*).

3 . Propriétés pharmacocinétiques et métabolisme

Ces propriétés comprennent la mesure *in vitro* des paramètres suivants : la stabilité plasmatique, la perméabilité membranaire (modèle Caco-2), la stabilité métabolique en présence de microsomes et d'hépatocytes, et le degré d'inhibition des cytochromes P450 (CYP1A2, 2D6, 2C9, 2C19, 3A4) pour lesquels aucune CI_{50} ne doit être inférieure à 1 μ M. A cela s'ajoutent des paramètres *in vivo*, dont la définition des propriétés pharmacocinétiques chez la souris et le rat (voies intraveineuse, i.v. et *per os*, p.o.) : clairance plasmatique (i.v.), aire sous la courbe, demi-vie d'élimination, volume de distribution (i.v.), biodisponibilité (p.o.), concentration plasmatique maximale (p.o.) et le temps auquel la concentration plasmatique maximale est obtenue (p.o.). La biodisponibilité doit être supérieure à 20 %.

4 . Efficacité chez l'animal

Le composé doit présenter une $DE_{90} < 50$ mg/kg dans un modèle de souris humanisée (*Severe Combined ImmunoDeficiency*, SCID-mouse) infectées par *P. falciparum* après l'administration de 4 doses successives, à la manière du modèle de Peter.

5 . Sécurité d'emploi

Le hit doit présenter une $CI_{50} > 1$ μ M vis-à-vis des canaux cardiaques hERG, et ne doit pas induire une phototoxicité ou des effets secondaires graves lors des études effectuées chez l'animal.

C . Propriétés du composé MR27770, chef-de-file des dérivés de la lanaroflavone

Le composé MR27770 a été choisi en tant que composé chef-de-file car il possède des propriétés inédites que nous allons présenter dans ce chapitre. C'est le composé le mieux caractérisé de cette étude, obtenu lors de la phase préliminaire de l'étude de RSA. Certains analogues de structure proche, et dont l'activité antipaludique a été optimisée seront traités en comparaison au Chapitre 3.

1 . Propriétés chimiques

La structure de MR27770 a été caractérisée et le composé a été synthétisé à plusieurs reprises de façon reproductible, sous sa forme base (MR27770) et sous sa forme sel (MR27770 sel).

La synthèse du composé MR27770 met en jeu un précurseur clé, un dérivé de 8-iodo flavone préparé en trois étapes au départ de l'acétophénone correspondante commerciale (**Figure 48**). La formation de la liaison C-C à l'aide d'une réaction pallado-catalysée de type Sonogashira et de N,N-diméthylprop-2-yn-1-amine permet d'introduire de manière efficace l'alcyne en position 8 (Chorley *et al.*, 2016). Par conséquent, le composé MR27770 porte une triple liaison en position 8. Cette triple liaison, par sa rigidité, oriente l'amine dans une région précise de l'espace. Le composé est polyméthoxylé car les réactions d'iodination et de Sonogashira imposent la protection préalable des hydroxyles libres. Cette synthèse est réalisée en peu d'étapes (n = 4).

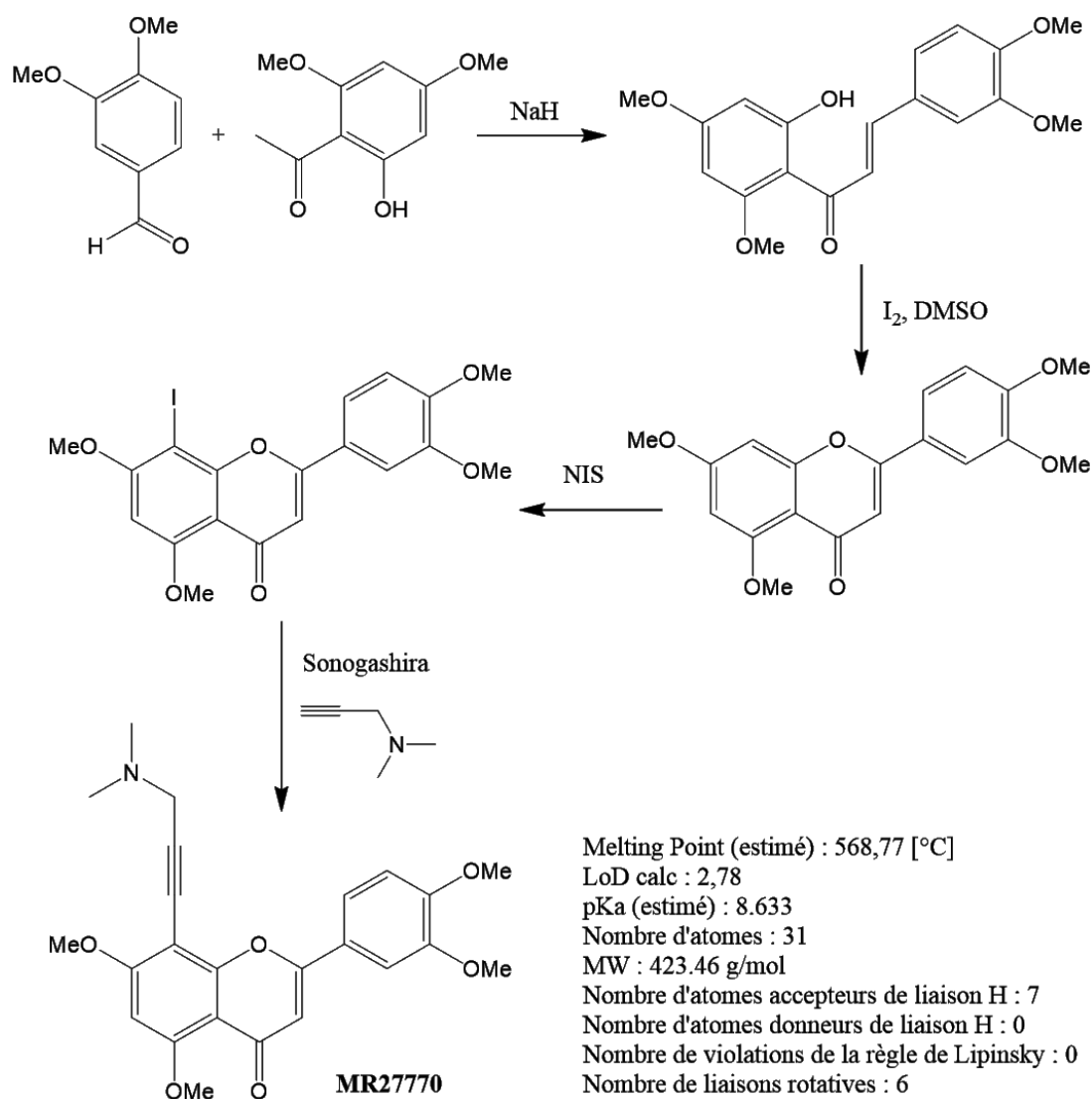


Figure 48. Schéma réactionnel permettant l'obtention de MR27770 en 4 étapes.

Le composé MR27770 répond aux règles de Lipinsky, ayant une masse moléculaire de 423 g/mol, un logP estimé à 2,78 (et un logD_{7,4} calculé à partir de la mesure du CHI de 2,59), un nombre d'atomes accepteur de liaisons hydrogène égal à 7 et aucun atome donneur de liaison hydrogène (Figure 48). Il présente une structure quasiment plane et n'a pas de centre chiral (Figure 49).

La solubilité du composé en solution tampon est en cours de détermination (collab. S. Charman, Monash Institute/MMV), de même que la stabilité chimique à pH 2 et 8 (UMR 7200). Le composé ne présente pas de caractéristiques chimiques pouvant laisser présager d'une éventuelle génotoxicité (pas d'amine aromatique de type aniline). Enfin, après une recherche SciFinder, il n'existe pas d'équivalent structural décrit pour le composé tête-de-série et la série chimique que celui-ci a inspirée. **Le composé MR27770 remplit donc les prérequis définis par MMV.**

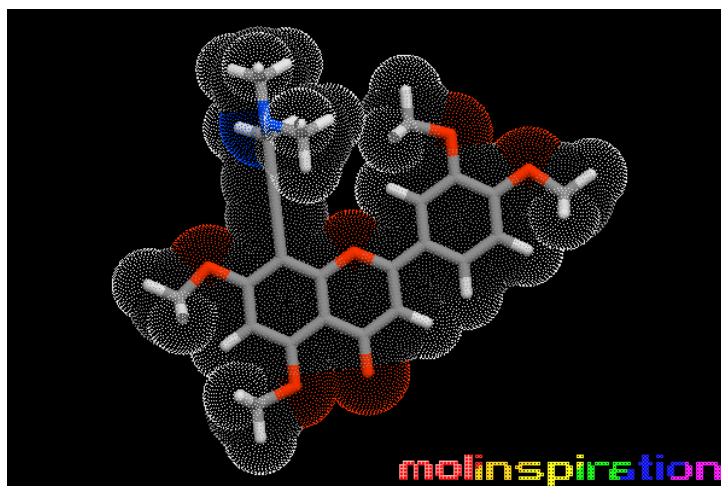


Figure 49. Représentation 3D du composé MR27770 obtenue à partir du site molinspiration (<http://molinspiration.com/>).

2. Propriétés pharmacologiques

i. Activité antipaludique et sélectivité

Il est à noter que deux tests complémentaires ont été utilisés parallèlement pour mesurer l'activité antiplasmodiale : la mesure de l'incorporation d'hypoxanthine tritiée évaluée en collaboration (M. Kaiser, Swiss TPH) et la mesure de la sécrétion de pLDH par le parasite via un kit ELISA utilisé à Strasbourg (E. Candolfi, IPPTS). Le premier permet de mettre en évidence la division parasitaire tandis que le second met en évidence la sécrétion d'une protéine parasitaire. La confirmation des résultats obtenus à Strasbourg (ELISA pLDH) par le test de référence réalisé à Bâle (incorporation de l'hypoxanthine tritiée) est essentielle étant donné que certains composés peuvent être faussement considérés comme inactifs s'ils ne présentent pas une action rapide. En effet, la pLDH a une demi-vie de 1,5 jours ce qui représente la moitié de la durée d'incubation des composés (72 heures). Ainsi, la pLDH peut toujours être détectée 1 à 2 jours après la mort du parasite et peut fausser les résultats obtenus si la mort du parasite n'est pas induite de façon rapide (Wein *et al.*, 2010).

Le composé MR27770 présente une CI_{50} vis-à-vis du parasite légèrement supérieure à 1 μ M (limite fixée par MMV) sur trois souches multi-résistantes de *P. falciparum* (**Tableau 3**).

Tableau 3. Activités biologiques du composé MR27770 vis-à-vis de différentes souches de *P. falciparum* et de différentes lignées cellulaires

<i>P. falciparum</i>					Cytotoxicité		
CI_{50} (SD)					CI_{50} (SD)		
μ M					μ M		
K1 ^a	K1 ^b	7G8 ^b	W2-mef ^b	L6 ^c	Hepa-1.6 ^d	pNHDF ^d	ThP1 ^d
1.9 (0.7)	2.3 (0.1)	2.1 (0.9)	2.8 (0.6)	28.3 -	> 70	> 77	5.2 (0.07)

a. CI_{50} déterminée en collaboration par le Swiss TPH (sérum = albumax II, test = mesure de l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée)

b. CI_{50} déterminée à l'IPPTS (sérum = alpha-calf, test = immunodétection de la pLDH)

c. CI_{50} déterminée en collaboration par le Swiss TPH (test = Alamar blue)

d. CI_{50} déterminée à l'IPPTS (test = WST-8, dérivé soluble du MTT)

K1 : souche multi-résistante : chloroquine, pyriméthamine, cycloguanil et sulfadoxine (Thaithong and Beale, 1981)

7G8 : souche multi-résistante : chloroquine, pyriméthamine et cycloguanil (Burkot *et al.*, 1984)

W2-mef : souche multi-résistante : chloroquine, pyriméthamine, cycloguanil, sulfadoxine et méfloquine (Oduola *et al.*, 1988)

L6 : myoblastes de muscle squelettique de rat (Yaffe, 1968)

Hepa-1.6 : cellules cancéreuses d'hépatome de souris (Darlington, 1987)

pNHDF (*Primary Normal Human Dermal Fibroblasts*) : fibroblastes humains de la peau non transformés en culture primaire (ATCC[®] PCS-201-010[™])

ThP1 : lignée de cellules cancéreuses de leucémie monocyttaire (Tsuchiya *et al.*, 1982)

Enfin, il présente un indice de sélectivité supérieur à 38.5 vis-à-vis de fibroblastes en culture primaire, modèle le plus pertinent de notre étude car ces cellules ne sont pas transformées. Ces données n'en font pas *a priori* un composé très attrayant mais il présente un profil pharmacologique remarquable qui en fait un composé chef-de-file unique.

ii . Liaison du composé aux protéines plasmatiques

La liaison du composé MR27770 aux protéines plasmatiques est en cours de détermination (collab. S. Chairman/MMV).

iii . Profil d'action sur le cycle érythrocytaire

Nous avons étudié la sensibilité des différents stades du cycle érythrocytaire au composé MR27770. Pour cela, nous avons défini 16 périodes de 3 heures pour couvrir le cycle de 48 heures. Des parasites de la souche 7G8 de *P. falciparum* synchronisés au stade anneau (entre 0 et 3 heures après l'invasion de l'hématie) ont été incubés pendant 3 heures avec 3 concentrations différentes de MR27770 (10 ; 5 et 2,5 μ M). Les résultats obtenus sont représentés sur la **Figure 50**.

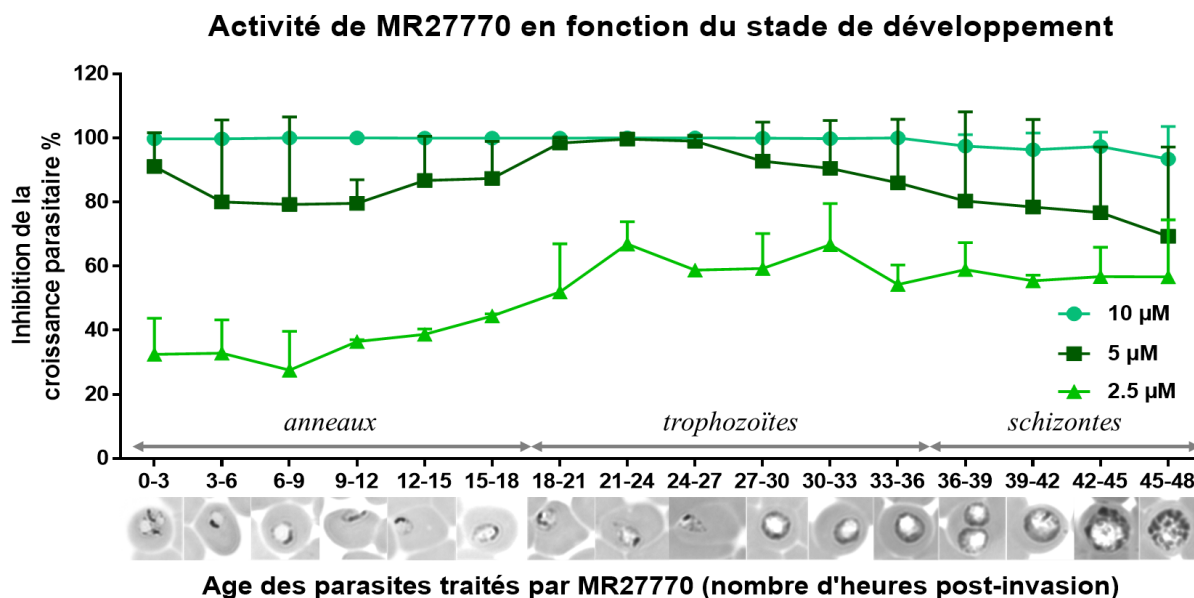


Figure 50. Profil d'action du composé MR27770 lors du cycle érythrocytaire. Une culture de *P. falciparum* 7G8 a été synchronisée (0-3 heures) et divisée en 16 périodes durant lesquelles les parasites sont traités pendant 3 heures puis lavés afin d'éliminer le composé. Les parasites sont ensuite remis en culture jusqu'à 72 heures après synchronisation, puis la parasitémie est évaluée microscopiquement et comparée à un contrôle traité par une concentration égale de DMSO. Trois concentrations de MR27770 ont été utilisées : 10 μ M (= 5 x CI_{50}), 5 μ M et 2,5 μ M. Les photos sous le graphe représentent le stade traité au temps t. Les points représentent la moyenne de deux expériences indépendantes (certains points ayant été réalisés en n = 3 : 0-3 h ; 3-6 h ; 6-9 h ; 27-30 h ; 30-33 h ; 42-45 h ; 45-48 h).

MR27770 inhibe la croissance du parasite tout au long du cycle, d'une manière concentration dépendante. A la concentration la plus élevée de 10 μM (soit environ 5 fois la CI_{50} mesurée sur la souche 7G8), l'activité est légèrement diminuée au stade schizonte, sans que cette différence ne soit significative (comparaison $t = 33$ et $t = 45$ heures, test de Mann-Withney, $p = 0,332$). De plus, 3 heures d'incubation avec le composé suffisent pour atteindre 100% de l'effet. A la concentration la plus faible, on observe un doublement de l'activité à partir du stade trophozoïte ($t = 18$ heures), les pourcentages d'inhibition de la croissance au stade anneau et aux stades trophozoïtes/schizontes étant statistiquement différents ($p < 0,0001$, **Figure 51**). Celle-ci semble diminuer au stade schizonte à 5 μM alors qu'elle reste stable à 2,5 μM jusqu'à la fin du cycle de 48 heures. A une concentration correspondant à cinq fois la valeur de CI_{50} , **MR27770 est donc actif tout au long du cycle érythrocytaire, dans des degrés similaires du stade anneau au stade schizonte. L'effet est exacerbé à partir du stade trophozoïte à la concentration la plus faible de 2,5 μM .** Ce profil d'activité, quasi constant tout au long du cycle érythrocytaire a été rarement décrit : le composé (+)-SJ733 (inhibiteur de *Pf*ATP4) semble présenter ce type de profil mais le temps d'incubation avec les différents stades de développement de *P. falciparum* s'étend jusqu'à la fin du cycle de 48 heures, ce qui signifie que les stades de développement ultérieurs à la synchronisation peuvent être responsables de l'effet observé (Jiménez-Díaz *et al.*, 2014). Nous nous sommes interrogés sur la signification d'un tel profil d'action d'un point de vue métabolisme parasitaire.

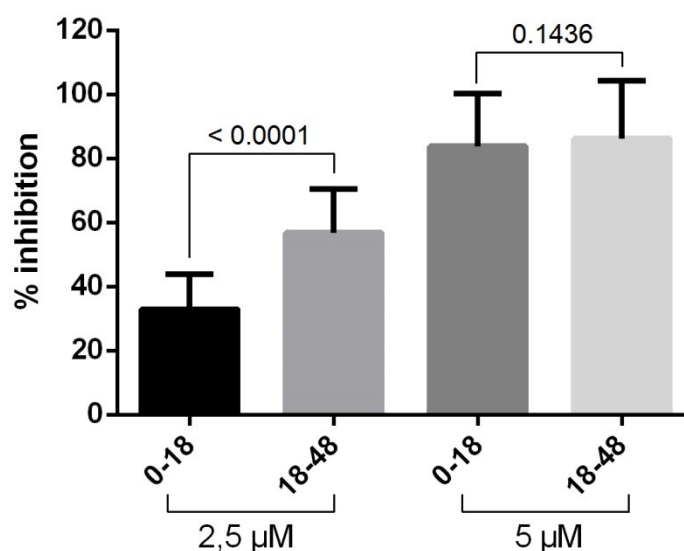


Figure 51. Activité de MR27770 à 2,5 et 5 μM aux stades anneau vs trophozoïte et schizonte. Les données de la **Figure 50** ont été regroupées pour le stade anneau (0-18 heures) et les stades trophozoïte et schizonte (18-48 heures). Les valeurs correspondent au degré de significativité déterminé par le test de Mann-Whitney.

Terkuile *et al.* ont étudié l'activité métabolique du parasite en fonction du stade de développement érythrocytaire. Ils ont utilisé l'hypoxanthine tritiée pour mesurer la synthèse d'acides nucléiques,

l'isoleucine tritiée pour la synthèse protéique et le lactate pour l'activité glycolytique. Ils ont pu mettre en évidence un pic de la synthèse d'ADN et/ou d'ARN à 33 heures post-invasion, une allure en plateau entre 27 et 33 heures pour la synthèse protéique, qui diminue ensuite lentement, et un pic de la glycolyse autour de 27 heures après invasion (**Figure 52**). Les pics d'activité mesurés se superposent au pic d'activité de MR27770 aux concentrations les plus faibles (21 à 33 heures), suggérant un possible effet de MR27770 sur ces voies. Néanmoins, ces voies métaboliques essentielles à la survie du parasite ne sont de loin pas les seules à être impliquées. Malheureusement la plupart des études de métabolomique non ciblée se sont concentrées sur la réponse de l'hôte et celles concernant le parasite ont été réalisées sur des stades bien particuliers dont le degré de synchronisation n'est soit pas connu, soit faible (Cobbold *et al.*, 2016; Creek *et al.*, 2016; Teng *et al.*, 2009, 2014), soit nul (cultures non synchronisées) (Sana *et al.*, 2013; Vo Duy *et al.*, 2012), ce qui limite la compréhension de l'activité métabolique du parasite en fonction de sa progression dans le cycle.

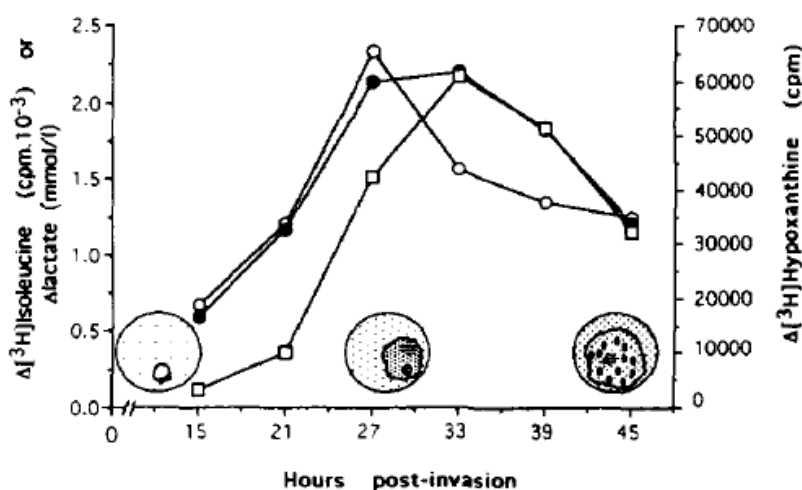


Figure 52. Activité métabolique de *P. falciparum* non traité en fonction du stade de développement parasitaire. La synthèse d'acides nucléiques est mesurée par l'incorporation d'hypoxanthine tritiée (□), la synthèse protéique par l'incorporation d'isoleucine tritiée (●) et la glycolyse par la production de lactate (○). Les parasites de la souche T9/96 ont été synchronisés en 0-6h par deux traitements successifs au sorbitol. D'après Terkuile *et al.*, 1993

Les effets décrits pour les antipaludiques commerciaux sont schématisés sur la **Figure 53**. La chloroquine (10 x CI₅₀), la quinine (10 x CI₅₀) et l'artémisinine (20 x CI₅₀) agissent essentiellement sur les stades anneaux âgés et trophozoïtes entre 12 et 30 heures post-invasion. L'effet maximum est constaté entre 18 et 24 heures, où la digestion de l'hémoglobine par le parasite est à son apogée, les anneaux jeunes et schizontes âgés étant peu sensibles (Terkuile *et al.*, 1993). Les dérivés quinoléiques amodiaquine, méfloquine, luméfántrine et pipéraquline semblent avoir un effet similaire (2 x CI₈₀, souche D10), bien que la méfloquine, l'amodiaquine et la pipéraquline seraient également capables de cibler les parasites plus jeunes. Cependant, il semblerait que ces composés soient capables de s'accumuler dans les globules rouges et les cultures ayant été incubé en continu avec les composés, il est donc difficile de conclure que ces composés ciblent effectivement le stade anneau (Wilson *et al.*, 2013).

L'action de l'artémisinine et de ses dérivés, sur le cycle érythrocytaire semble en réalité complexe. Les anneaux sont cent fois moins sensibles au traitement que les trophozoïtes pour une exposition de 4 heures. Cependant, les stades anneaux jeunes, entre 2 et 4 heures post-invasion, montrent une hypersensibilité à l'artémisinine (CI_{50} mesurée 100 fois plus faible que sur les anneaux plus âgés, souche 3D7). De plus, le stade anneau devient sensible lors d'expositions plus longues (6 heures). L'activité de l'artémisinine semble donc à la fois concentration et temps-dépendante, en fonction du stade ciblé (Klonis *et al.*, 2013). Wilson *et al.* ont quant à eux mis en évidence l'effet de l'artémisinine et de l'artésunate sur des schizontes purifiés (42-48 heures post-invasion). Ces deux traitements présentaient une action différente sur les schizontes matures : l'artémisinine était capable d'inhiber la rupture des schizontes alors que l'artésunate n'avait aucun effet (Wilson *et al.*, 2013).

Les auteurs ont également montré que le traitement d'anneaux par l'atovaquone menait à une accumulation de formes âgées ressemblant à des schizontes sans mérozoïtes alors qu'elle n'a aucun effet sur les schizontes (Wilson *et al.*, 2013).

Les antifolates agissent essentiellement sur les trophozoïtes âgés et les schizontes, entre 32 à 42 heures après l'invasion du globule rouge, moment où la synthèse d'acides nucléiques est la plus prononcée (Dieckmann and Jung, 1986).

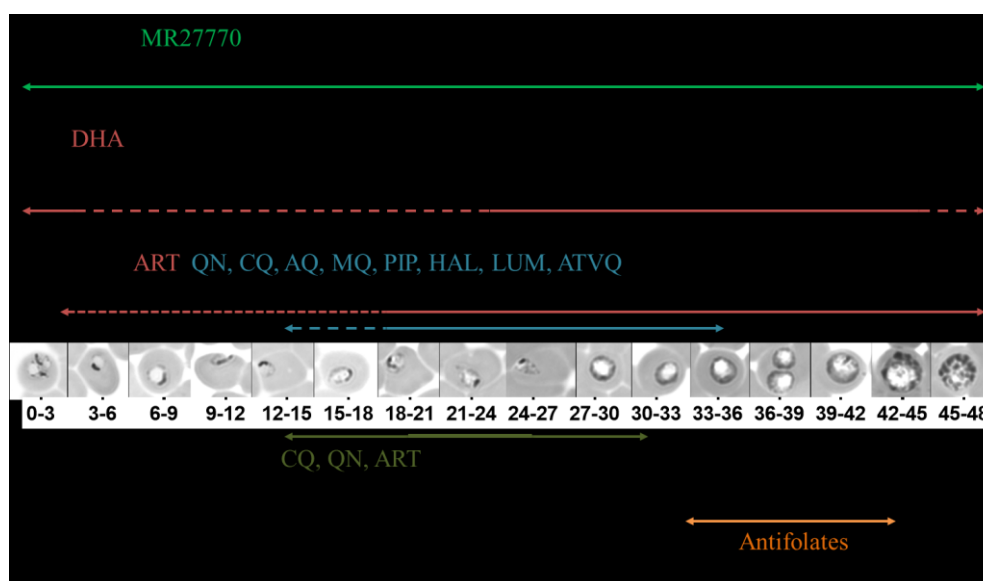


Figure 53. Action des médicaments existants durant le cycle érythrocytaire de *P. falciparum*. Synchro = degré de synchronisation de la culture de *P. falciparum*, DHA = dihydroartémisinine, ART = artémisinine, QN = quinine, CQ = chloroquine, AQ = amodiaquine, MQ = méfloquine, PIP = pipéraquline, HAL = halofantrine, LUM = luméfantrine, ATVQ = atovaquone.

En conclusion, la seule classe de composés permettant d'obtenir un effet tout au long du cycle est la classe des artémisinines, mais l'effet sur les stades anneaux est perdu lors d'incubations de courte durée (4 heures) (Klonis *et al.*, 2013), alors que MR27770 élimine 100% des stades anneaux après seulement 3 heures d'incubation.

Par conséquent, MR27770 présente un profil d'activité différent des médicaments antipaludiques actuellement employés en thérapeutique, par son niveau d'activité constant quel que soit le stade sanguin considéré.

iv . Rapidité d'action (« Killing rate »)

Un paramètre important à déterminer pour un composé antipaludique est le « killing rate ». Il consiste à déterminer le temps d'exposition à un antipaludique nécessaire pour éliminer 100 % du parasite. Pour cela, nous avons utilisé le test décrit par Sanz *et al.* qui consiste à incuber les parasites pendant différentes périodes avec 10 x la CI_{50} du composé, à laver la culture traitée et à réaliser une dilution au 1/3 en cascade de cette culture avec des globules rouges sains. Le nombre de parasites survivants après trois semaines est corrélé au nombre de puits où le parasite s'est développé (Sanz *et al.*, 2012) (Chapitre Matériel et Méthodes, point B.10). En d'autres termes, le *killing rate* consiste à mesurer une possible recrudescence, jusqu'à trois semaines après l'exposition à la drogue, en remettant en culture les parasites qui auraient survécu à cette exposition. En effet, une action apparemment rapide peut s'avérer instable dans le temps : s'il ne subsiste que quelques parasites après l'exposition à la drogue testée, ceux-ci ne seront pas détectés par le test employé si leur nombre se situe sous le seuil de détection de ce test. Prolonger le temps de culture des parasites traités à plusieurs semaines, cette fois en l'absence de traitement, permet une prolifération suffisante des rares parasites qui auraient pu survivre à la phase d'exposition tout en échappant à leur détection. MR27770 présentant une action rapide, il était important de vérifier que l'effet observé après 3 heures d'incubation était stable dans le temps. En d'autres termes, que 100 % des parasites sont bien éliminés après 3h d'exposition à 10 fois la valeur de CI_{50} du composé.

Nous avons pu mettre en évidence que MR27770 présente effectivement une action rapide. L'absence de recrudescence trois semaines après l'arrêt du traitement est obtenue après une incubation de 12 heures (Figure 54).

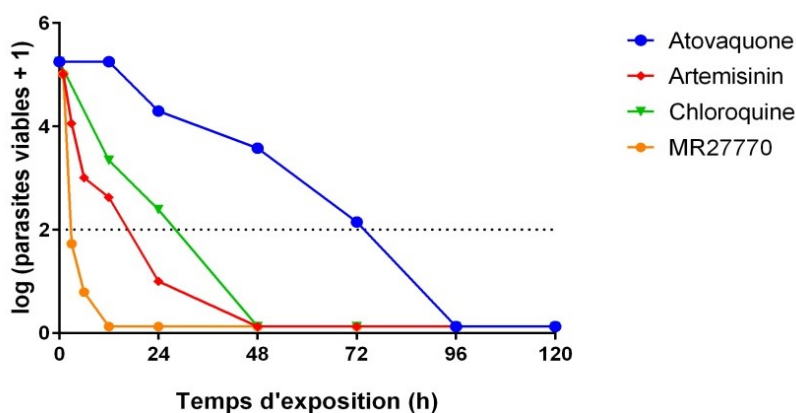


Figure 54. « Killing rate ». Profils de viabilité parasitaire obtenus après incubation de 1 à 120 heures avec 10 x la CI_{50} d'atovaquone, d'artémisinine, de chloroquine et de MR27770. Souche 7G8, n = 1.

Tableau 4. Paramètres issus de l'expérience de *killing rate* pour MR27770 et trois médicaments de référence ayant des rapidités d'action différentes : chloroquine, artémisinine et atovaquone.

Composé	Lag phase (h)	Log(PRR)	PCT _{99,9%} (h)
MR27770	0	> 5	2,7
Chloroquine	0	2,3	28
Artemisinine	0	> 5	16,6
Atovaquone	24/48	2,1	74,4

Lag phase = temps nécessaire pour atteindre la vitesse d'action maximale ; **Log(PRR)** = *Parasite Reduction Rate*, réduction parasitaire sur un cycle de 48h [$\log(\text{nombre de parasites à 24h}) - \log(\text{nombre de parasites à 72h})$], exprimé en log du nombre de parasites ; **PCT_{99,9%}** = temps nécessaire pour réduire le nombre de parasites viables de 3 logs.

Les paramètres définis à partir de ces données (**Tableau 4**) nous indiquent que tout comme l'artémisinine ou la chloroquine, MR27770 induit un effet immédiat (Lag phase = 0 heures). De plus, comme l'artémisinine, MR27770 permet de réduire de plus de 5 logs le nombre de parasite au cours d'un cycle parasitaire (log PRR). Enfin, cette réduction est plus rapide qu'avec l'artémisinine (2,7 heures pour une réduction de 3 logs de la charge parasitaire), alors que 16h sont nécessaires à l'artémisinine pour obtenir le même effet (PCT_{99,9%}). MR27770 présente donc une action extrêmement rapide vis-à-vis des stades érythrocytaires de *P. falciparum*.

D'après les données de la littérature décrivant la rapidité d'action de composés tête-de-série actuellement en développement mesurée selon le même protocole (**Tableau 5**), **MR27770 est le composé le plus rapide jamais décrit**. Ces résultats suggèrent une nouvelle fois que le mécanisme d'action de MR27770 se distingue de celui des médicaments sur le marché ou en développement.

Tableau 5. Rapidité d'action ou « *Killing rate* » de composés tête-de-série antipaludiques décrite dans la littérature et déterminées selon le protocole de Sanz *et al.*, 2012.

Nom du composé ou de la classe	Mécanisme d'action	Profil <i>killing rate</i>	Référence
Plasmodione	équilibre redox	similaire à l' artémisinine (5 fois la CI ₅₀)	Ehrhardt <i>et al.</i> , 2016
ACT-451840	non connu	similaire à la chloroquine	Le Bihan <i>et al.</i> , 2016
BIX-01294 et TM2-115	inhibiteurs d'histone méthyle transférase	similaire à la chloroquine	Malmquist <i>et al.</i> , 2015
Triaminopyrimidines	résistance médiée par la mutation d'un gène codant pour une ATP synthase vacuolaire	similaire à la chloroquine	Hameed P. <i>et al.</i> , 2015
Pyrimidines trisubstituées	non connu	similaire à la pyriméthamine	Norcross <i>et al.</i> , 2016

Nom du composé ou de la classe	Mécanisme d'action	Profil <i>killing rate</i>	Référence
(+)-SJ733	inhibiteur de <i>Pf</i> ATP4	similaire à la pyriméthamine (mais <i>in vivo</i> élimination plus rapide que l'artésunate)	Jiménez-Díaz <i>et al.</i> , 2014
DDD107498	inhibiteur de eEF2, facteur d'élongation essentiel à la synthèse protéique	similaire à l'atovaquone	Baragaña <i>et al.</i> , 2015
DSM265	inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase mitochondriale	similaire à l'atovaquone à 10 et 100 fois la CI ₅₀	Phillips <i>et al.</i> , 2015
MR27770	non connu	Supérieur à l'artémisinine	Nardella <i>et al.</i> , 2017, en préparation

Le profil d'action sur les différentes phases du cycle érythrocytaire, ajouté aux données de *killing rate* obtenues, suggèrent que MR27770 a un effet concentration-dépendant plutôt que temps-dépendant. L'effet rapide de MR27770 nous laisse penser que le composé induit un dommage irréversible après seulement trois heures d'incubation avec une concentration efficace.

v . Activité vis-à-vis d'isolats cambodgiens de *P. falciparum* adaptés à la culture

Lorsque le mécanisme d'action est inconnu, MMV recommande d'évaluer d'éventuelles résistances croisées entre le composé tête-de-série et les différentes classes médicamenteuses pour lesquelles il existe des résistances documentées. De plus, l'inoculât parasitaire minimum permettant d'obtenir des mutants résistants au composé doit être déterminé.

J'ai eu l'occasion lors d'une mobilité de 6 mois à l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC) d'évaluer l'activité du composé MR27770 vis-à-vis d'isolats de *P. falciparum* de terrain adaptés en culture *in vitro*. En effet, le fait que MR27770 soit actif tout au long du cycle parasitaire et notamment sur les stades du cycle résistants à l'artémisinine — *early rings* (Witkowski *et al.*, 2013) — nous a conduits à évaluer l'activité de ce composé vis-à-vis d'isolats multi-résistants à ce stade. Dans un premier temps nous avons caractérisé les résistances associées aux souches que nous avons utilisées.

a . Caractérisation des résistances associées aux isolats cliniques utilisés dans l'étude

Différents paramètres ont été étudiés pour caractériser les souches utilisées :

- pour déterminer l'état de résistance aux dérivés de l'artémisinine, nous avons utilisé le test *ring stage survival assay* (RSA) consistant à estimer le pourcentage de parasites survivants par rapport au contrôle 72 heures après l'incubation d'anneaux jeunes (0-3 heures) avec 880 nM de dihydroartémisinine (DHA) pendant 6 heures ; la DHA est le métabolite actif unique de tous les dérivés de l'artémisinine. Il est employé à la concentration de 880 nM car elle correspond à la concentration plasmatique chez le patient traité ;
- les résultats de ce test ont été confirmés par la caractérisation des mutations présentes au sein du gène *kelch13* responsable de la résistance à l'artémisinine (réalisé au préalable à l'IPC) ;
- la résistance à la pipéraquline a été évaluée par le test *piperaquine survival assay* (PSA) qui consiste à estimer le pourcentage de parasites survivants par rapport au contrôle 72 heures après l'incubation de anneaux jeunes (0-3 heures) avec 200 nM de pipéraquline (PPQ) pendant 48 heures ;
- le nombre de copies du gène *pfmdr1*, associé à la résistance à la méfloquine et la perte de sensibilité à la luméfántrine, a été répertorié dans les cas où il était connu (réalisé au préalable à l'IPC) ;
- l'état de résistance à la méfloquine et à la déséthylamodiaquine — métabolite actif de l'amodiaquine — a été évalué par la détermination de la CI₅₀ de ces composés, la valeur seuil de 60 nM ayant été choisie dans les deux cas, au regard de la littérature, comme seuil de résistance ;
- l'état de résistance à la chloroquine n'a pas été évalué compte tenu de l'omniprésence de cette résistance au Cambodge.

Les résultats obtenus pour ces souches sont répertoriés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Résistances associées aux isolats cliniques cambodgiens de *P. falciparum* utilisés pour déterminer l'activité de MR27770.

Souche	DHA (RSA)	<i>K13</i>	PPQ (PSA)	<i>pfmdr1</i> CN	CI ₅₀ MQ nM	CI ₅₀ deAQ nM
<i>Souche de laboratoire</i>						
3D7	0,22	WT	0	1	42	12
<i>Isolats</i>						
5150	0	WT	0	1	42	20
5188	0	WT	0	1	37	38
6591	0,66	WT	0	2	70	48
6356	0	WT	0,38	2	92	53
6857	0	WT	S	1	nd	nd
6862	0	WT	S	1	nd	nd
5122	3,7	WT	S	2	nd	nd

Souche	DHA (RSA)	<i>K13</i>	PPQ (PSA)	<i>pfmdr1</i> CN	CI ₅₀ MQ nM	CI ₅₀ deAQ nM
5375	11,3	C580Y	1,2	3	58	36
4903	24,9	I543T	0	?	56	48
6270	5,24	Y493H	0,79	3	79	61
5403	2,9	C580Y	1,1	3	90	62
6349	24,8	C580Y	1,3	2	156	70
6307	12,2	C580Y	1,3	4	105	88
6337	15,4	C580Y	0	3	45	152
4703	10	C580Y	S	?	nd	nd
6372	12,4	C580Y	77,2	1	28	153
6320	7,39	C580Y	51,6	1	12	53
6213	8,5	C580Y	39,4	1	30	143
6298	16,01	C580Y	26,6	1	31	118
6280	18,67	C580Y	17,12	1	6	136

DHA = dihydroartémisinine, PPQ = pipéraquline, MQ = méfloquine, deAQ = desethylamodiaquine ; RSA = *ring stage survival assay*, pourcentage de survie ; PSA = *piperazine survival assay*, pourcentage de survie ; *pfmdr1* CN = nombres de copies du gène *pfmdr1*. 3D7 = souche de laboratoire sensible. Valeur seuil d'IC₅₀ conférant une résistance à la méfloquine et à l'amodiaquine = 60 nM. WT = *wild-type* = sensible, C580Y, I543T, Y493H = mutations du gène *kelch13* conférant une résistance à l'artémisinine

La résistance à l'artémisinine est associée au polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) sur le gène *kelch* présent sur le chromosome 13 (*K13*), ce qui permet aux stades anneaux jeunes du parasite de résister à un pulse de 6 heures de DHA (le temps d'incubation et la concentration utilisée sont liés aux propriétés pharmacocinétiques des dérivés de l'artémisinine) (Straimer *et al.*, 2015; Witkowski *et al.*, 2013). Les données obtenues correspondent parfaitement à la résistance à une pulse de 6 heures de DHA (Figure 55).

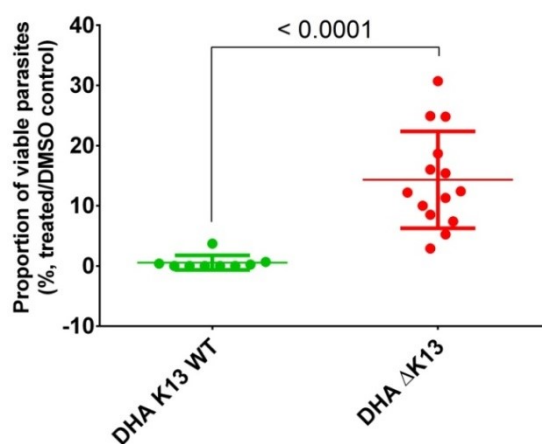


Figure 55. Corrélation entre la capacité du parasite à résister à une pulse de 6 heures de 880 nM de dihydroartémisinine (DHA) et la présence d'une mutation du gène *kelch13* (K13). K13 WT = *kelch13 wild-type*, souches sensibles à l'artémisinine ; Δ K13 = mutations du gène *kelch13* conférant une résistance à l'artémisinine. Test non paramétrique de Mann-Whitney

Il a également été montré que la résistance à la pipéraquline est toujours associée à une mutation du gène K13 et à un nombre de copies du gène *pfmdr1* égal à 1, la résistance à la méfloquine (nombre de copies *pfmdr1* > 1) semblant incompatible avec l'émergence de résistance à la pipéraquline (Duru *et al.*, 2015). A nouveau, les données obtenues se conforment à ce modèle de résistance (Figure 56).

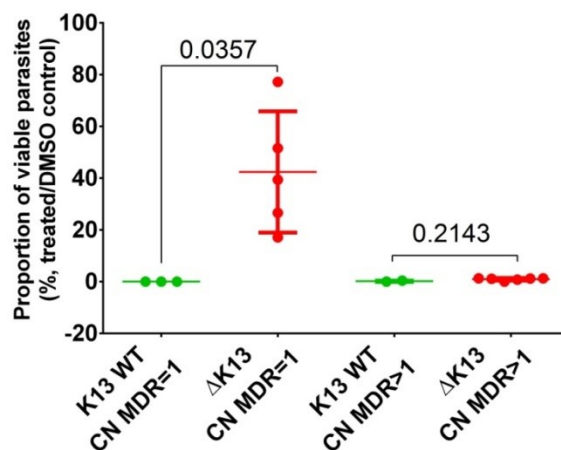


Figure 56. Corrélation entre la capacité du parasite à résister à une pulse de 48 heures de 200 nM de pipéraquline et la présence d'une mutation du gène *kelch13* (K13) et du nombre de copies du gène *pfmdr1*. K13 WT = *kelch13* wild-type, souches sensibles à l'artémisinine ; ΔK13 = mutations du gène *kelch13* conférant une résistance à l'artémisinine ; CN MDR = 1, nombre de copies du gène *pfmdr1* égal à 1, corrélé à une sensibilité à la méfloquine ; CN MDR > 1, nombre de copies du gène *pfmdr1* supérieur à 1, corrélé à une résistance à la méfloquine ; test non paramétrique de Mann-Whitney

La présence d'une augmentation du nombre de copies *pfmdr1* est bien corrélée à l'augmentation de la IC_{50} de la méfloquine (Figure 57).

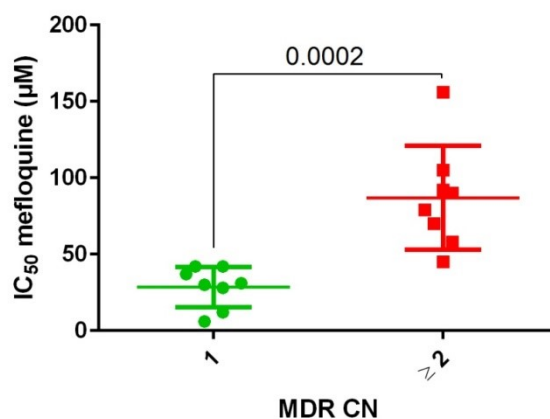


Figure 57. Activité de la méfloquine en fonction du nombre de copies du gène *pfmdr1* (MDR CN) de la souche de *P. falciparum* (test non paramétrique de Mann-Whitney)

Enfin, la détermination de la résistance à l'amodiaquine des isolats utilisés s'est faite uniquement sur une base phénotypique en considérant les seuils décrits dans la littérature.

b . Activité de MR27770 vis-à-vis des isolats cliniques caractérisés

(1) Résistants à l'artémisinine

(i) A concentration fixe vs concentration fixe de DHA

L'évaluation de l'activité du composé MR27770 a été réalisée uniquement par le test *ring stage survival assay* (RSA) où des anneaux jeunes sont exposés pendant 6 heures à une concentration de 5 μ M de MR27770 soit 2,5 x CI_{50} sur 7G8. Cette concentration a été choisie comme compromis pour ne pas trop s'éloigner de la concentration utilisée pour la DHA (880 nM) tout en tenant compte du seuil d'activité de MR27770. Les CI_{50} de MR27770 vis-à-vis des différentes souches n'ont pas été déterminées, faute de temps.

Les résultats obtenus montrent que MR27770 reste actif quel que soit le statut de la souche, sensible (K13 WT) ou résistante (K13 muté) à l'artémisinine. En effet, bien que des différences d'activité soient observées entre les isolats, la différence entre les souches artémisinine-sensibles et artémisinine-résistantes n'est pas significative (**Figure 58**, $p = 0,3439$, test de Mann-Whitney).

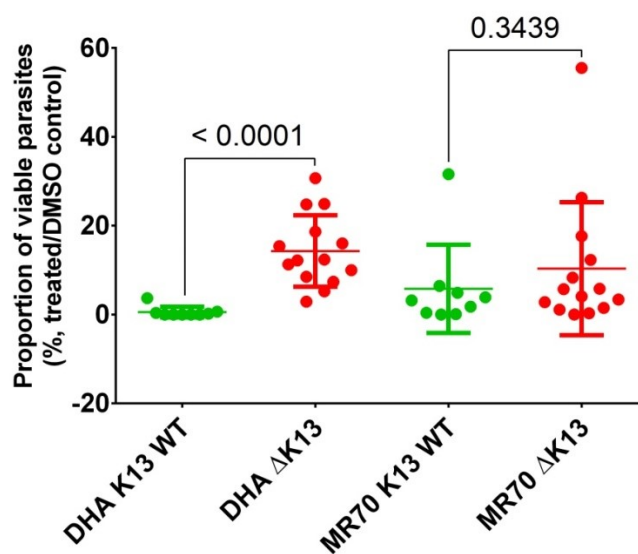


Figure 58. Effet de MR27770 (MR70, 5 μ M) et de la dihydroartémisinine (DHA, 880 nM) sur les souches sensibles ou résistantes à l'artémisinine présentant d'une mutation du gène *kelch13* (K13). Test non paramétrique de Mann-Whitney

Tout se passe comme si MR27770 agissait indifféremment vis-à-vis d'une souche sensible à l'artémisinine et d'une souche résistante à l'artémisinine.

De plus, la représentation de la réponse au test RSA pour MR27770 en fonction de la réponse à la DHA montre clairement qu'il n'y a pas de corrélation entre les deux réponses, le coefficient de corrélation étant quasi nul ($p = 0,8039$, **Figure 59**).

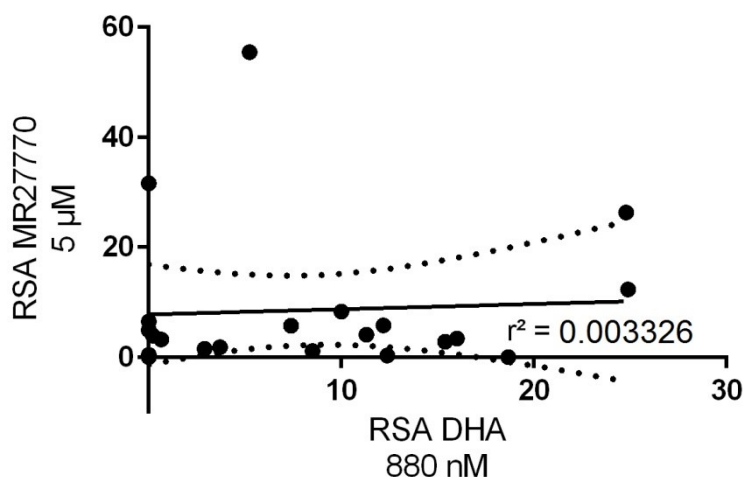


Figure 59. Corrélation entre l'effet de 5 µM de MR27770 et l'effet de 880 nM de DHA. Le coefficient de corrélation (r^2) est proche de zéro et la pente n'est pas significativement différente de zéro ($p = 0,8039$)

(ii) *A l'aide d'une gamme de concentration en présence ou en absence d'artémisinine*

De plus, l'effet de MR27770 a été mesuré dans le même test en utilisant cette fois une gamme de concentration de cinq points entre 50 et 3,125 µM, de façon à vérifier que celui-ci soit concentration-dépendant. Trois souches ont été retenues pour cette mesure : une souche présentant une RSA élevée pour MR27770 à 5 µM (6349 ; 24,8 % de parasites viables ; **Figure 60**), une souche présentant une RSA intermédiaire (6298 ; 16,0 % de parasites viables ; **Figure 61**) et une souche présentant une RSA faible (6270 ; 5,2 % de parasites viables ; **Figure 62**). La même gamme de MR27770 a été réalisée en ajoutant une concentration fixe de DHA (700 nM, procurant le même effet que la concentration de 880 nM utilisée précédemment), de façon à mettre en évidence un éventuel effet additif. Le contrôle utilisé dans ce cas pour le calcul de viabilité est traité uniquement par 700 nM de DHA.

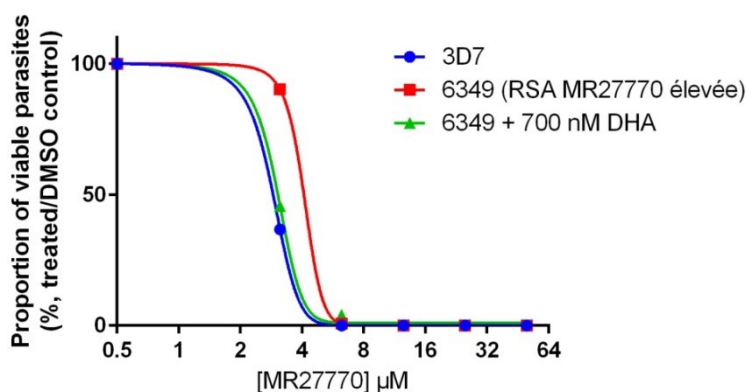


Figure 60. Courbe d'inhibition obtenue pour la souche 6349 après traitement de 6 heures par des concentrations croissantes de MR27770 +/- une concentration fixe de dihydroartémisinine (DHA, 700 nM). La souche de laboratoire 3D7 sert de référence comme souche sensible aux antipaludiques ($n = 1$).

La courbe de CI_{50} obtenue pour MR27770 vis-à-vis de la souche 6349 est, comme attendu, décalée par rapport à la souche 3D7 car elle présente une des RSA les plus élevées pour MR27770 à 5 μM . La valeur de CI_{50} obtenue est de 3,4 μM contre 0,8 μM pour 3D7. Cependant, une concentration de 6,25 μM de MR27770 permet d'éliminer tous les parasites quel que soit leur statut de résistance. De plus, quand les parasites sont traités à la fois par MR27770 et une concentration fixe de DHA (700 nM), on retrouve une courbe correspondant à celle de la souche sensible aux antipaludiques utilisée comme référence ($CI_{50} = 1,3 \mu\text{M}$). MR27770 est donc capable de tuer une partie des parasites résistants, 700 nM de DHA n'étant pas suffisants pour éliminer 100 % des parasites résistants à l'artémisinine. L'action de MR27770 semble synergique avec la DHA vis-à-vis de cette souche.

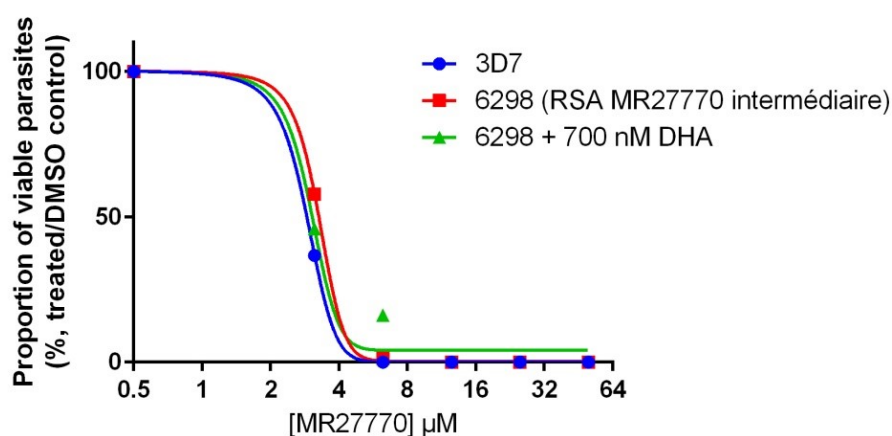


Figure 61. Courbe d'inhibition obtenue pour la souche 6298 après traitement de 6 heures par des concentrations croissantes de MR27770 +/- une concentration fixe de dihydroartémisinine (DHA, 700 nM). La souche de laboratoire 3D7 sert de référence comme souche sensible aux antipaludiques (n = 1)

Dans le cas de la souche 6298 qui est par ailleurs peu résistante à l'artémisinine (RSA = 3,4 %) et modérément sensible à MR27770, la courbe d'inhibition ne s'éloigne pas de celle de la souche de référence 3D7. La valeur de CI_{50} obtenue est de 1,8 μM contre 0,8 μM pour la souche 3D7. Là encore, une concentration de 6,25 μM de MR27770 permet d'éliminer la totalité des parasites quel que soit leur statut de résistance. Les parasites traités par MR27770 en plus d'une concentration fixe de DHA (700 nM), présentent une CI_{50} de 1,6 μM , l'effet de la combinaison MR27770/DHA semble donc additif dans ce cas.

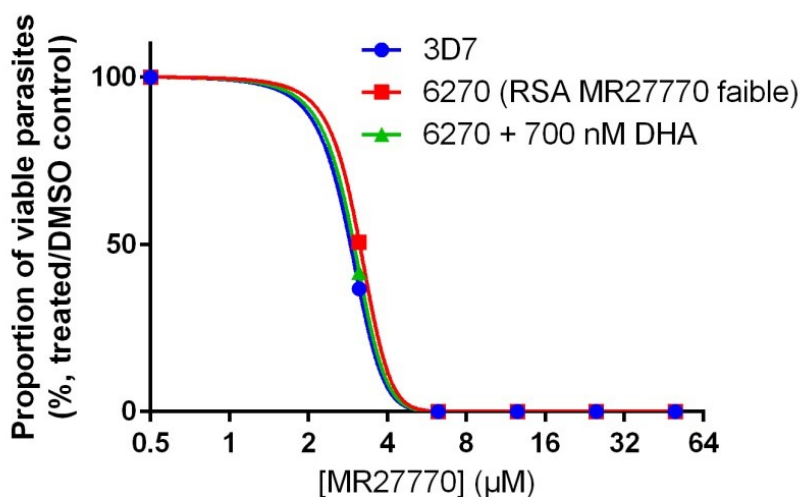


Figure 62. Courbe d'inhibition obtenue pour la souche 6270 après traitement de 6 heures par des concentrations croissantes de MR27770 +/- une concentration fixe de dihydroartémisinine (DHA, 700 nM). La souche de laboratoire 3D7 sert de référence comme souche sensible (n = 1)

Enfin, la souche 6270 qui présente une mutation *K13* Y493H est fortement résistante à l'artémisinine (RSA = 55,5 % de parasites viables) et sensible au MR27770. La courbe d'inhibition de MR27770 est similaire à celle obtenue sur la souche 6298 avec une CI_{50} de 1,4 µM. L'ajout de DHA permet de diminuer la CI_{50} à une valeur de 1,0 µM. L'effet semble donc là encore additif.

(iii) *Activité de MR27770 vis-à-vis d'isolats résistants à l'artémisinine mutés sur le gène kelch13*

Enfin, MR27770 a été évalué sur un isolat résistant à l'artémisinine (4912) avant et après manipulation génétique sur le gène *kelch13*. La mutation effectuée sur le gène *kelch13* vise à restaurer la sensibilité de la souche à l'artémisinine. Pour cela, des mutations silencieuses sont insérées légèrement en amont et en aval de la séquence à modifier et serviront de site de liaison de la *zinc finger nuclease* (sites BS). En effet, la mutation *K13* I543T (où l'isoleucine est remplacée par une thréonine en position 543) menant à la résistance a été remplacée par le SNP *wild type* I543 par manipulation génétique à l'aide de *zinc finger nucleases* (collaboration D. Fidock, Columbia University, NY). Deux mutants ont été obtenus : 4912 BSmut G6, contrôle présentant la mutation I543T et des mutations silencieuses codant pour les sites de liaison de la *zinc finger nuclease* (BS) et 4912 BSmut C11 présentant les sites de liaison BS et le génotype WT I543 (**Tableau 7**). La souche contrôle 4912 BSmut G6 présente une RSA identique à la souche 4912 (27,7 et 30,7 % de viabilité respectivement) ce qui confirme que l'insertion de sites BS dans le génome n'a pas eu d'impact. Néanmoins, cette manipulation génétique (ou le clonage de la souche) a eu un effet étant donné que les CI_{50} sont augmentées pour la méfloquine et l'amodiaquine, pour les 2 clones. MR27770 présente une diminution du RSA entre l'isolat 4912 et les clones contrôle 4912 BSmut G6 et *wild type* 4912 BSmut C11. Cette diminution semble liée à un effet consécutif à la manipulation génétique ou au clonage de la souche, étant donné que le RSA passe

de 17 % pour la souche I543T à 0,1 et 3,9 % pour les clones, qu'ils soient *wild type* ou I543T. Il serait donc intéressant de connaître l'origine de cet effet.

Tableau 7. Résistances associées à l'isolat 4912 de *P. falciparum* et aux souches obtenues par génétique inverse utilisés pour déterminer l'activité de MR27770. DHA = dihydroartémisinine, PPQ = pipéraquline, MQ = méfloquine, AQ = amodiaquine ; RSA = *ring stage survival assay*, pourcentage de survie ; PSA = *piperaquine survival assay*, pourcentage de survie.

	Souche	DHA (RSA) 880 nM	MR27770 (RSA) 5 µM	<i>K13</i>	PPQ (PSA)	CI ₅₀ MQ nM	CI ₅₀ AQm nM
S	4912 BSmut C11	0,4	0,1	WT (I543)	1.14	84	116
R	4912 BSmut G6 (contrôle)	27,7	3,9	I543T	0	77	101
R	4912 (isolat)	30,7	17,6	I543T	0	57	86

En conclusion, l'ensemble de ces données indiquent que **MR27770 ne présente pas de résistances croisées avec l'artémisinine**. Néanmoins, le fond génétique de certains isolats du Cambodge semble réduire la sensibilité de certaines souches résistantes à l'artémisinine vis-à-vis de MR27770. Cette sensibilité diminuée est cependant surmontable en augmentant légèrement la concentration, comme nous l'avons vu avec la souche 6349. De plus, l'association MR27770/DHA est synergique dans le cas où la souche est moins sensible à MR27770.

(2) Résistants à la pipéraquline

MR27770 ne présente pas de résistance croisée avec la pipéraquline dans la limite des isolats testés. En effet, les souches pipéraquline-résistantes ($\Delta K13$, CN MDR = 1, n = 5 ; **Figure 63**) sont toutes sensibles au MR27770 après 6 heures d'incubation à 5 µM (test RSA).

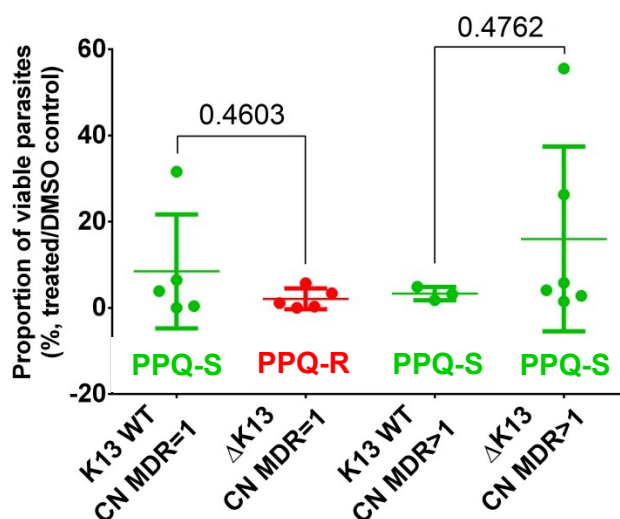


Figure 63. Corrélation entre la capacité du parasite à résister à une pulse de 6 heures de 5 µM de MR27770 et la présence d'une mutation du gène *kelch13* (*K13*) et du nombre de copies du gène *pfmdr1*. PPQ-R = pipéraquline-résistant (n = 5), PPQ-S = pipéraquline-sensible (n = 13). Test non paramétrique de Mann-Whitney

(3) Résistants à la méfloquine et à l'amodiaquine

MR27770 ne semble pas présenter de résistances croisées avec la méfloquine (**Figure 64**) ou l'amodiaquine (**Figure 65**), même si ces résultats devraient être confirmés par une mesure de CI_{50} de MR27770 dans les mêmes conditions (exposition pendant 48 heures et mesure de l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée).

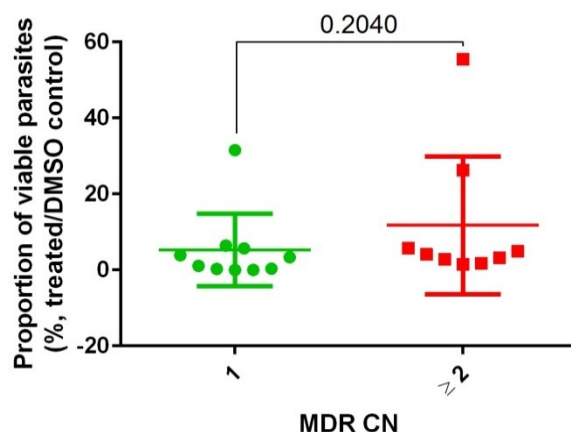


Figure 64. Activité de MR27770 (RSA) en fonction du nombre de copies du gène *pfmdr1*. MDR CN = 1, isolats sensibles à la méfloquine ; MDR CN \geq 2, isolats résistants à la méfloquine

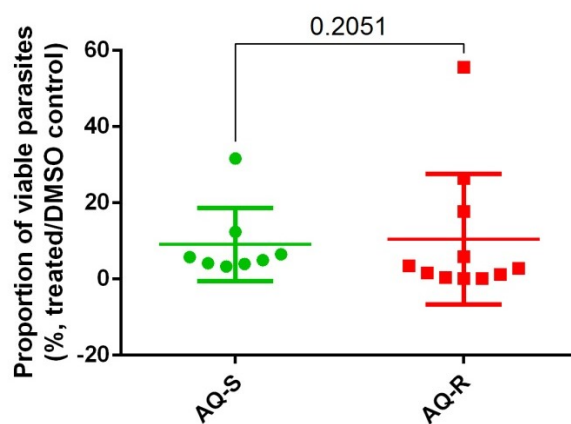


Figure 65. Activité de MR27770 (RSA) en fonction du statut de résistance à l'amodiaquine. AQ-S : $CI_{50} < 60$ nM ; AQ-R : $CI_{50} > 60$ nM

La perte de sensibilité au MR27770 semble légèrement corrélée à l'augmentation de la CI_{50} vis-à-vis de la méfloquine mais cet effet n'est pas significatif ($p = 0,1586$; **Figure 66**).

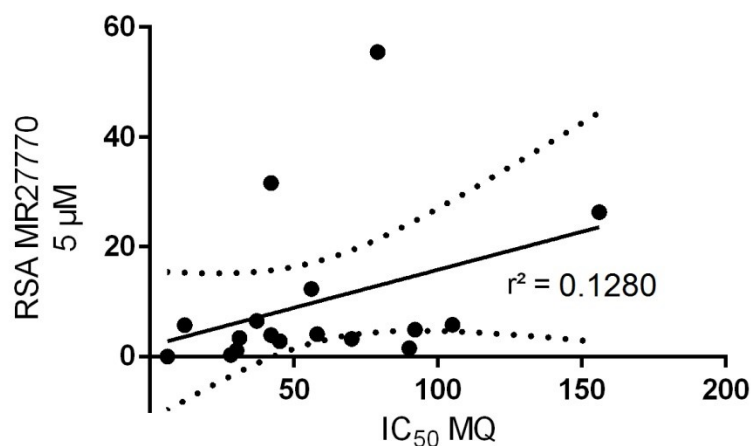


Figure 66. Régression linéaire entre l'effet de MR27770 et la CI_{50} de la méfloquine vis-à-vis d'isolats sensibles et résistants à la méfloquine. La pente n'est pas significativement différente de zéro ($p = 0,1586$). Les courbes en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95 %

Pour l'amodiaquine, l'effet est inversé : une augmentation de la CI_{50} de l'amodiaquine, en d'autres termes une perte de sensibilité à l'amodiaquine semble augmenter la sensibilité à MR27770 mais là encore l'effet n'est pas significatif ($p = 0,2009$; Figure 67).

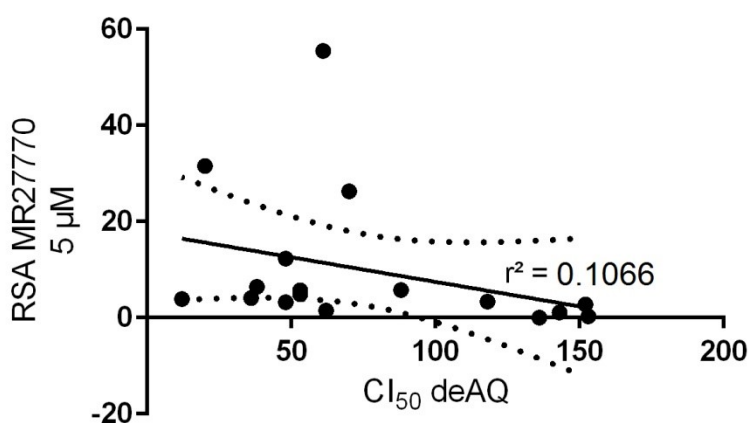


Figure 67. Régression linéaire entre l'effet de MR27770 et la CI_{50} de la déséthylamodiaquine. La pente n'est pas significativement différente de zéro ($p = 0,2009$). Les courbes en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95 %

En conclusion, MR27770, dans la limite des isolats testés, ne présente pas de résistance croisée avec les antipaludiques majeurs en usage aujourd'hui.

vi. Sélection de mutants résistants à MR27770

Dans un premier temps, nous avons obtenu un clone de la souche W2-mef par dilution clonale. Afin d'obtenir des mutants résistants à MR27770, ce clone a été soumis à une pression continue à cinq fois la CI_{50} de MR27770 (7 μ M vis-à-vis du clone W2-mef obtenu) à partir d'un *inoculum* de 1.10^8 parasites, pendant 60 jours (Partie méthodologique, point B.11).

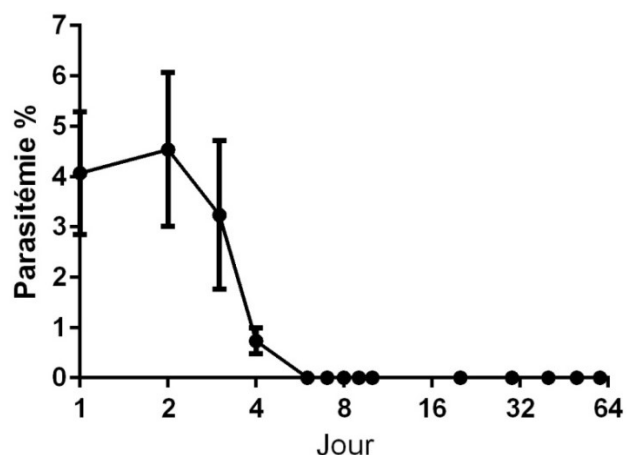


Figure 68. Parasitémie observée en fonction du temps après la mise sous pression de trois cultures d'un même clone de *P. falciparum* W2 (clone D11) avec 5 x la CI_{50} de MR27770

La parasitémie baisse progressivement à partir de J2 pour s'annuler à J6. Aucune recrudescence du parasite ne sera mise en évidence ultérieurement, même trois semaines après l'arrêt du traitement à J60 (Figure 68). Cette expérience sera à réitérer avec un inoculum de 1.10^9 parasites et sous pression discontinue. Néanmoins, il a été décrit que plus l'effet du composé est rapide, plus il est difficile d'obtenir une souche résistante *in vitro* (Francisco-Javier Gamo, *Learning from phenotypic screening*, ASTMH annual meeting 2016, Atlanta). Compte tenu de la rapidité d'action de MR27770, l'obtention d'un mutant résistant devrait donc s'avérer compliquée. Néanmoins, il a été possible d'obtenir des mutants résistants à l'artémisinine (Straimer *et al.*, 2015), dont la rapidité d'action n'est plus à démontrer. Cependant la mise sous pression s'est étendue sur une période particulièrement longue de cinq ans (Ariey *et al.*, 2014; Witkowski *et al.*, 2010). Le type de modification génétique impliquée dans la résistance semble donc plus jouer dans la capacité d'obtenir des mutants résistants : si la mutation ou l'amplification d'un seul gène est impliquée dans la résistance, l'obtention de clones résistants est en théorie possible même si cela peut prendre plus ou moins longtemps en fonction du mécanisme du composé. Par contre, si la résistance fait appel à plusieurs mutations de gènes différents, il est quasi impossible d'obtenir des clones résistants *in vitro*. Néanmoins, le fait que MR27770 n'ait pas permis d'obtenir des mutants résistants est rassurant mais ne conditionne pas le fait que des résistances *in vivo* ne peuvent apparaître, un ensemble de facteurs étant impliqués dans l'émergence de résistances.

En conclusion, bien que MR27770 ait une activité modérée *in vitro*, il présente un profil d'activité antiplasmodiale inédit qui le démarque des médicaments disponibles ou en développement. Il cible tout le cycle érythrocytaire de façon quasi constante, c'est le composé le plus rapide décrit actuellement et il ne présente pas de résistances croisées avec les médicaments disponibles. De plus la rapidité d'action de MR27770 en fait un composé tête-de-série prometteur car ce type de profil pharmacologique est prioritairement recherché en remplacement des antipaludiques actuels.

3 . Propriétés pharmacocinétiques et métabolisme

i . Paramètres mesurés *in vitro*

La stabilité plasmatique de MR27770 a été réalisée en collaboration avec la plateforme TechMed^{III}. Les flavones étant connues pour leur élimination rapide *in vivo*, une durée courte d'incubation (1 heure) avait été choisie originellement. MR27770 est stable dans du plasma de souris à une concentration de 1 μM : 100 % de la concentration initiale est toujours présente après une heure d'incubation à 37°C. Cette mesure devra être réitérée avec un temps d'incubation plus long.

La perméabilité membranaire n'a pas été mesurée mais a été estimée comme probable à 74.8 % avec le logiciel en ligne admetSAR et présente une valeur estimée de 1,61 cm/s. De même, l'absorption intestinale est probable à 99,2 % (Cheng et al., 2012).

La stabilité métabolique en présence de microsomes et d'hépatocytes est en cours de détermination (collab. S. Charman, Monash Institute/MMV).

MR27770 n'inhibe pas les CYP450 et présente des valeurs de CI_{50} vis-à-vis des cytochromes impliqués dans des interactions médicamenteuses supérieures à 50 μM (**Tableau 8**). La valeur limite supérieure fixée par MMV est de 1 μM et idéalement de 10 μM . MR27770 remplit donc pleinement ce critère.

Tableau 8. Inhibition des cytochromes P450 par le composé MR27770 (CI_{50} en μM)

Composé	CI_{50} (μM)				
	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4-M
MR27770	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

Incubation 10 min à 37°C, 8 concentrations, cytochromes humains (prestation externalisée WuXi AppTec, Shanghai)

ii . Paramètres mesurés *in vivo*

Les propriétés pharmacocinétiques ont été mesurées chez la souris, par voies intraveineuse (i.v.), intrapéritonéale (i.p.) et *per os* (p.o.). Les paramètres mesurés sont présentés dans le **Tableau 9** (prestation externalisée WuXi AppTec, Shanghai)

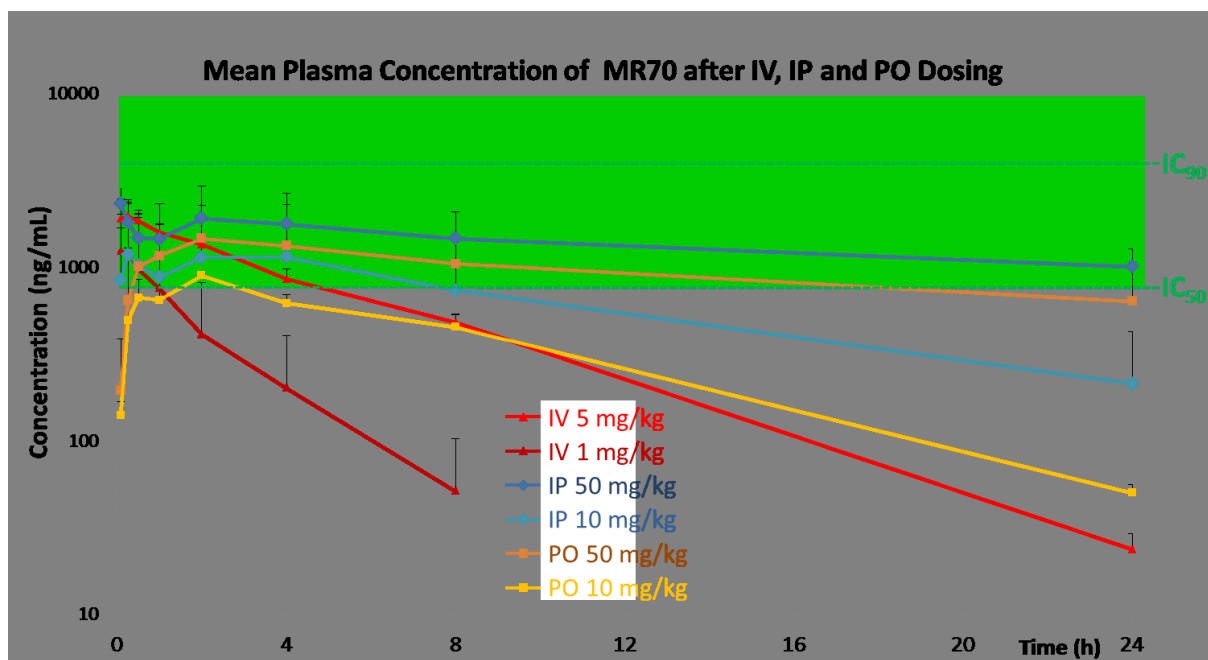


Figure 69. Concentration plasmatique après injection i.v., i.p. ou p.o. du composé MR27770 chez la souris (3 animaux par groupe). La CI_{50} et la CI_{90} pour *P. falciparum* sont représentées. Prestation externalisée WuXi AppTec, Shanghai

Tableau 9. Paramètres pharmacocinétiques mesurés chez la souris pour MR27770.

	i.v. 5 mg/kg	i.v. 1 mg/kg	i.p. 50 mg/kg	i.p. 10 mg/kg	p.o. 50 mg/kg	p.o. 10 mg/kg
C_0/C_{max} (SD) (ng/ml)	1947 (191)	1290 (291)	2313 (526)	1287 (148)	1470 (295)	893 (20,5)
T_{max} (SD) (h)	/	/	1,39 (2,26)	2,17 (1,76)	1,67 (0,577)	2,00 (0)
F (SD) (%)	/	/	25,4	56,5	17,5	30,2
AUC_{0-inf} (SD) (ng.h/ml)	10571 (739)	2740 (288)	70908 (7828)	17277 (2755)	51044 (37984)	8221 (719)
$T_{1/2}$ (SD) (h)	3,80 (0,191)	1,98 (0,156)	26,3 (3,54)	8,56 (0,8)	24,6 (19,3)	5,38 (0,136)
Cl (SD) (ml/min/kg)	7,91 (0,549)	6,13 (0,683)	/	/	/	/
$V_{d_{ss}}$ (SD) (l/kg)	2,62 (0,215)	0,929 (0,0384)	/	/	/	/

C_0 = concentration initiale (i.v.), C_{max} = concentration maximale atteinte (i.p., p.o.), T_{max} = temps où la concentration maximale est atteinte, F = biodisponibilité, AUC_{0-inf} = aire sous la courbe entre le temps 0 et extrapolée à un temps infini, $T_{1/2}$ = demi-vie plasmatique, Cl = clairance plasmatique, $V_{d_{ss}}$ = volume de distribution à l'équilibre (*steady state*, temps extrapolé à l'infini). Prestation externalisée WuXi AppTec, Shanghai.

La demi-vie plasmatique de MR27770 en administration i.p. et p.o. à 50 mg/kg est supérieure à 24 heures ce qui s'avère intéressant compte tenu de la rapidité d'action du composé. Les flavones naturelles sont connues pour leur élimination rapide, bien que plus lente pour les composés polyméthoxylés. En effet, Manthey *et al.* ont décrit les propriétés pharmacocinétiques de la tangerétine

et de la nobilétine, deux flavones polyméthoxylées, dont la demi-vie après injection de 50 mg/kg i.p. chez le rat est inférieure à 4 heures (**Figure 70**). L'administration p.o. de la même dose induit une demi-vie similaire, bien que la biodisponibilité de la tangérétine semble beaucoup plus faible que celle de la nobilétine, d'où l'intérêt d'une double substitution en 3' et 4'. Les principaux métabolites sont mono-déméthylés en 4' ou bien glucuroconjugués en 4', ce qui a tendance à augmenter leur solubilité et favoriser leur élimination dans les urines (Manthey *et al.*, 2011). En revanche, la demi-vie du composé MR27770 après l'administration d'une dose cinq fois plus faible de 10 mg/kg n'est que de 5,4 à 8,5 heures, mais reste supérieure à la limite inférieure fixée par MMV qui est de 4 heures et représente 2 à 3 fois le temps nécessaire à l'élimination de 99,9 % des parasites *in vitro*. La demi-vie après injection i.v. est beaucoup plus courte (entre 2 et 4 heures) bien que la clairance soit relativement faible (6 à 8 ml/kg/min environ). Le composé semble donc présenter une absorption prolongée en cas d'injection en i.p. et p.o.

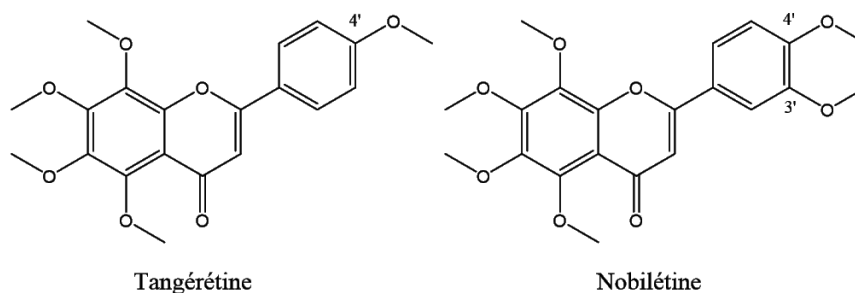


Figure 70. Structures de la tangérétine et de la nobilétine décrites dans la référence Manthey *et al.*, 2011

La concentration maximale est, quant à elle, atteinte rapidement (en 2 heures environ quelle que soit la voie d'administration) mais ne dépasse pas 2,3 µg/ml dans le meilleur des cas (50 mg/kg i.p.), ce qui représente environ 2 fois la valeur de CI_{50} vis-à-vis de *P. falciparum*. On peut donc s'attendre à un effet antipaludique partiel chez l'animal.

La biodisponibilité à 10 mg/kg est de 30%, soit deux fois plus élevée à la dose de 10 mg/kg qu'à la dose de 50 mg/kg, suggérant un effet de saturation de l'absorption. Elle reste néanmoins supérieure aux 20 % recommandés par MMV.

Enfin, le volume de distribution du composé est faible (< 2 l/kg). Ceci nous indique une diffusion tissulaire faible et une distribution essentiellement plasmatique, ce qui ne pose pas de problème dans notre contexte car le cycle érythrocytaire ciblé se déroule, comme son nom l'indique, dans le sang.

Le composé MR27770 présente donc une pharmacocinétique inattendue et intéressante. Etant donné que l'effet de MR27770 semble plutôt concentration-dépendant et qu'un temps d'incubation très court suffit à obtenir 100 % de l'effet, un dérivé qui présente le même profil d'action avec une CI_{50} améliorée inférieure à la $C_{max}/10$ devrait permettre d'obtenir un composé totalement actif chez l'animal.

4 . Efficacité *in vivo*

L'activité *in vivo* de MR27770 a été évaluée dans un modèle murin, en utilisant le test des quatre jours de Peter. La dose administrée a été fixée à 100 mg/kg, ce qui représente une dose élevée. Ce choix a été motivé par l'activité très moyenne de MR27770 *in vitro*.

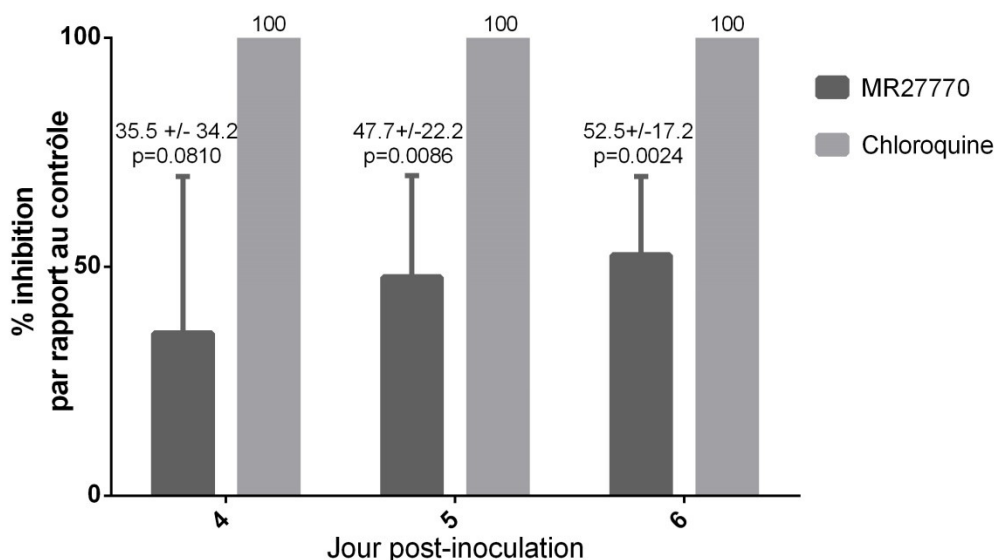


Figure 71. Activité *in vivo* de MR27770 (4 x 100 mg/kg) et de la chloroquine (4 x 25 mg/kg) obtenue sur des souris Swiss infectées par 2.10⁶ globules rouges infectés par *P. berghei* ANKA. La parasitémie a été mesurée par lecture de frottis sanguins colorés au Giemsa à J4, J5 et J6, n = 5 animaux par groupe. Les valeurs représentent le pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire (+/- écart-type) et le degré de significativité du test de Student par rapport à la valeur 0.

MR27770 présente une activité qui devient significative à J5 et J6, probablement grâce à sa présence prolongée au niveau plasmatique (Figure 71). Les propriétés pharmacocinétiques prometteuses de MR27770 semblent donc être la clé de son activité *in vivo* chez la souris impaludée. Ceci nous conforte dans l'idée qu'un dérivé présentant une CI₅₀ plus faible permettrait d'obtenir un effet plus important *in vivo* et nous encourage à entreprendre la pharmacomodulation approfondie de la série.

Le composé n'a pas été évalué dans un modèle de souris humanisée et reste à optimiser, cependant la preuve de concept a pu être faite quant à l'activité *in vivo* des dérivés de la lanaroflavone.

5 . Sécurité d'emploi

L'activité vis-à-vis des canaux cardiaques hERG n'a pas encore été évaluée. Aucun effet secondaire n'a été mis en évidence suite à l'administration de 300 mg/kg de MR27770 (observation de l'animal).

D . Conclusion

Medicine for Malaria Venture a émis une série de lignes directrices pour accélérer le développement de nouveaux antipaludiques et prioriser les séries chimiques présentant des propriétés *drug-like* et un

mécanisme d'action original. Nous avons montré dans ce chapitre que le composé choisi comme tête-de-série, MR27770, s'intègre parfaitement dans le cadre d'un hit validé, voire au-delà.

En effet, MR27770 présente des propriétés chimiques drug-like en répondant aux règles de Lipinsky et en présentant un $\log D_{7,4}$ adéquat (2,59) dans l'optique d'une pharmacomodulation. De plus sa synthèse est facile (4 étapes) et obtenue à partir de précurseurs commerciaux de faible coût.

MR27770 présente de plus des propriétés pharmacologiques inédites car, bien que son activité et sa sélectivité *in vitro* soient légèrement en dessous des limites fixées par MMV, il présente une combinaison d'atouts uniques : il est actif tout au long du cycle érythrocytaire après seulement trois heures d'incubation avec le parasite, et présente notamment une activité vis-à-vis des stades anneaux jeunes résistants à l'artémisinine. De plus, c'est le composé à l'action la plus rapide décrite actuellement. Il présente une activité conservée sur des isolats multirésistants de patients cambodgiens à l'artémisinine, la pipéraquline, la méfloquine et/ou l'amodiaquine suggérant un mécanisme d'action potentiellement original. Enfin, l'action rapide de ce composé rend moins probable la sélection de mutants résistants *in vitro*, bien que ces expériences soient à réitérer.

MR27770 n'inhibe pas les cytochromes impliqués dans les interactions médicamenteuses les plus fréquentes ($CI_{50} > 50 \mu M$ vis-à-vis des CYP 1A2, 2D6, 2C9, 2C19 et 3A4) et présente un profil plasmatique en adéquation avec son action rapide (absorption continue, élimination lente). La biodisponibilité est importante (30%). Cependant, la C_{max} qui reste très moyenne, ne correspond qu'à environ deux fois la valeur de CI_{50} obtenue *in vitro*, et ne permet d'obtenir qu'un effet partiel chez l'animal malade. Le profil pharmacocinétique de MR27770 est clairement à exploiter dans l'étude de RSA visant à optimiser l'activité *in vivo* de la série qui en est issue. Ces résultats montrent que l'activité obtenue pour MR27770 peut être améliorée et que ses propriétés pharmacocinétiques sont adaptées à une efficacité *in vivo*.

Enfin, le composé MR27770 ne présente pas d'effets secondaires jusqu'à une dose de 300 mg/kg, du moins aucune modification du comportement de l'animal n'a été mise en évidence.

Par conséquent, MR27770 remplit donc le cahier des charges émit par MMV et a suscité une étude de RSA approfondie donnant lieu à une nouvelle classe prometteuse de composés antipaludiques. Par ailleurs, le profil pharmacologique inédit de MR27770 a suscité tout récemment le soutien de MMV qui s'est concrétisé par la prise en charge d'essais permettant de préciser et de compléter ce profil. De plus, ces travaux feront l'objet d'une publication en préparation pour le journal *Antimicrobial Agents Chemotherapy* intitulé «*Flavone derivatives : fast-acting compounds with sustained activity against artemisinin-resistant falciparum malaria parasites*» par F. Nardella, S. Stiebing, P. Wagner, M. Schmitt, V. Collot, D. Ménard, B. Witkowski, E. Candolfi, C. Vonthron-Sénécheau.

Tableau 10. Tableau récapitulatif des propriétés du composé tête-de-série MR27770 par rapport aux prérequis MMV pour un composé *Target Candidate Profile 1*.

Propriétés chimiques	Prérequis	MR27770	
Composé re-synthétisé (oui/non) ?	oui	oui	✓
Structure chimique clairement caractérisée (oui/non) ?	oui	oui	✓
Masse moléculaire (g/mol)	< 500	423	✓
LogD à pH 7.4	< 5	2,59	✓
Nombre de donneur de liaison H	< 5	0	✓
Nombre d'accepteur de liaison H	< 10	7	✓
Nombre de centres stéréochimiques	< 3	0	✓
Si chiralité, racémique ou isomère ?		NA	
Nombre d'étapes de synthèse à partir de réactifs commerciaux		4	✓
Solubilité en milieu aqueux à pH 6 (µM)	≥ 10µM	en cours	⚠
Point de fusion		568,77°C (estimé)	
pKa (mesuré)		ND	
Stabilité chimique (pH 2 et pH 8)		en cours	⚠
Risque de génotoxicité (basé sur la structure)	Pas de risque évident	Pas de risque évident	✓
Recherche <i>Scifinder</i> réalisée sur la structure et la série chimique	Nouveauté ?	oui	✓
Propriétés pharmacologiques			
CI ₅₀ obtenue pour le test phénotypique	CI ₅₀ < 1 µM	1,9-2,8 µM	⚠
Pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques <i>in vitro</i>	Mesuré	En cours	⚠
Indice de sélectivité (préciser la lignée cellulaire)	> 10	38,5 (pNHDF)	✓
Stades de développement intra-érythrocytaires ciblés		tous	✓
PRR (Log ₁₀) et temps nécessaire à l'induction de l'effet (h) mesurés <i>in vitro</i> (<i>killing rate</i>)		> 5 Log ₁₀ 0 h	✓
Mécanisme d'action	Nouveau, basé sur le phénotype et l'absence de résistances croisées	Phénotype nouveau, pas de résistances croisées	✓
IC ₅₀ vis-à-vis d'isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i>		à faire	

<i>Inoculum</i> minimum pour induire une résistance (souche)	> 10 ⁸ (W2-mef)	
Niveau d'activité minimal vis-à-vis du mutant résistant	NA	
Marqueur moléculaire de résistance	NA	
Perte de vitalité du parasite due à la résistance ?	NA	

Propriétés pharmacocinétiques et métabolisme

in vitro

Stabilité plasmatique	> 1h	
Perméabilité membranaire Caco-2	1,61 cm/s (estimée)	
Stabilité métabolique en présence de microsomes/hépatocytes	Mesuré	En cours
Inhibition des CYP450 (CYP1A2, 2D6, 2C9, 2C19, 3A4)	> 1 µM	> 50 µM
Métabolites identifiés <i>in vitro</i>		ND
Activité des métabolites majeurs vis-à-vis de <i>P. falciparum</i> (CI ₅₀)		ND

in vivo

Souris i.v. (1 mg/kg), Clairance (ml/min/kg), AUC (ng.h/ml), T _{1/2} (h), Volume de distribution (l/kg)		Cl = 6,1 AUC = 2740 T _{1/2} = 2,0 Vd = 0,9 T _{max} = 2,0	
Souris p.o. (10 mg/kg), T _{max} (h), C _{max} (ng/ml), AUC (ng.h/ml), F (%), T _{1/2} (h)	F > 20%	C _{max} = 893 AUC = 8221 F = 30,2 T _{1/2} = 5,4	
Rat i.v. (dose), Clairance (ml/min/kg), AUC (ng.h/ml), T _{1/2} (h), Volume de distribution (l/kg)		ND	
Rat p.o. (dose), T _{max} (h), C _{max} (ng/ml), AUC (ng.h/ml), F (%), T _{1/2} (h)	F > 20%	ND	

Efficacité *in vivo*

<i>P. falciparum</i> DE ₉₀ souris PfSCID	< 50 mg/kg	ND	
Souche de <i>Plasmodium</i> utilisée <i>in vivo</i> et résultats		<i>P. berghei</i> ANKA, 35 à 52 % d'inhibition à 100 mg/kg	

Sécurité d'emploi

hERG CI ₅₀ uM (patch clamp)		ND	
Phototoxicité		ND	
Effets secondaires mis en évidence lors de manipulations <i>in vivo</i>		RAS 300 mg/kg	

NA = non applicable ; ND = non déterminé ; zones grisées = données non indispensables pour un hit validé.

Bibliographie du chapitre 1

- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., *et al.* (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505, 50–55.
- Baragaña, B., Hallyburton, I., Lee, M.C.S., Norcross, N.R., Grimaldi, R., Otto, T.D., Proto, W.R., Blagborough, A.M., Meister, S., Wirjanata, G., *et al.* (2015). A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature* 522, 315–320.
- Burkot, T.R., Williams, J.L., and Schneider, I. (1984). Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* clones grown *in vitro* from the same isolate. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 339–341.
- Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., Lee, P.W., and Tang, Y. (2012). admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J Chem Inf Model* 52, 3099–3105.
- Chorley, D.F., Furkert, D.P., and Brimble, M.A. (2016). Synthesis of the Spiroketal Core of the Pinnatifinoside Family of Natural Products: Synthesis of the Spiroketal Core of the Pinnatifinoside Family. *European Journal of Organic Chemistry* 2016, 314–319.
- Cobbold, S.A., Chua, H.H., Nijagal, B., Creek, D.J., Ralph, S.A., and McConville, M.J. (2016). Metabolic Dysregulation Induced in *Plasmodium falciparum* by Dihydroartemisinin and Other Front-Line Antimalarial Drugs. *J. Infect. Dis.* 213, 276–286.
- Creek, D.J., Chua, H.H., Cobbold, S.A., Nijagal, B., MacRae, J.I., Dickerman, B.K., Gilson, P.R., Ralph, S.A., and McConville, M.J. (2016). Metabolomics-Based Screening of the Malaria Box Reveals both Novel and Established Mechanisms of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6650–6663.
- Darlington, G.J. (1987). Liver cell lines. *Meth. Enzymol.* 151, 19–38.
- Dieckmann, A., and Jung, A. (1986). Stage-specific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to antifolates. *Z Parasitenkd* 72, 591–594.
- Duru, V., Khim, N., Leang, R., Kim, S., Domergue, A., Kloeung, N., Ke, S., Chy, S., Eam, R., Khean, C., *et al.* (2015). *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant *K13* parasites presenting high survival rates in novel piperaquine *in vitro* assays: retrospective and prospective investigations. *BMC Medicine* 13.
- Ehrhardt, K., Deregnacourt, C., Goetz, A.-A., Tzanova, T., Gallo, V., Arese, P., Pradines, B., Adjalley, S.H., Bagrel, D., Blandin, S., *et al.* (2016). The Redox Cycler Plasmodione Is a Fast-Acting Antimalarial Lead Compound with Pronounced Activity against Sexual and Early Asexual Blood-Stage Parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60, 5146–5158.
- Hameed P., S., Solapure, S., Patil, V., Henrich, P.P., Magistrado, P.A., Bharath, S., Murugan, K., Viswanath, P., Puttur, J., Srivastava, A., *et al.* (2015). Triaminopyrimidine is a fast-killing and long-acting antimalarial clinical candidate. *Nature Communications* 6, 6715.
- Jiménez-Díaz, M.B., Ebert, D., Salinas, Y., Pradhan, A., Lehane, A.M., Myrand-Lapierre, M.-E., O’Loughlin, K.G., Shackelford, D.M., Justino de Almeida, M., Carrillo, A.K., *et al.* (2014). (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E5455-5462.

- Klonis, N., Xie, S.C., McCaw, J.M., Crespo-Ortiz, M.P., Zaloumis, S.G., Simpson, J.A., and Tilley, L. (2013). Altered temporal response of malaria parasites determines differential sensitivity to artemisinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 5157–5162.
- Le Bihan, A., de Kanter, R., Angulo-Barturen, I., Binkert, C., Boss, C., Brun, R., Brunner, R., Buchmann, S., Burrows, J., Dechering, K.J., *et al.* (2016). Characterization of Novel Antimalarial Compound ACT-451840: Preclinical Assessment of Activity and Dose-Efficacy Modeling. *PLoS Med.* *13*, e1002138.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* *23*, 3–25.
- Malmquist, N.A., Sundriyal, S., Caron, J., Chen, P., Witkowski, B., Menard, D., Suwanarusk, R., Renia, L., Nosten, F., Jiménez-Díaz, M.B., *et al.* (2015). Histone methyltransferase inhibitors are orally bioavailable, fast-acting molecules with activity against different species causing malaria in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 950–959.
- Manthey, J.A., Cesar, T.B., Jackson, E., and Mertens-Talcott, S. (2011). Pharmacokinetic Study of Nobiletin and Tangeretin in Rat Serum by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *59*, 145–151.
- Norcross, N.R., Baragaña, B., Wilson, C., Hallyburton, I., Osuna-Cabello, M., Norval, S., Riley, J., Stojanovski, L., Simeons, F.R.C., Porzelle, A., *et al.* (2016). Trisubstituted Pyrimidines as Efficacious and Fast-Acting Antimalarials. *J. Med. Chem.* *59*, 6101–6120.
- Phillips, M.A., Lotharius, J., Marsh, K., White, J., Dayan, A., White, K.L., Njoroge, J.W., El Mazouni, F., Lao, Y., Kokkonda, S., *et al.* (2015). A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. *Sci Transl Med* *7*, 296ra111.
- Sana, T.R., Gordon, D.B., Fischer, S.M., Tichy, S.E., Kitagawa, N., Lai, C., Gosnell, W.L., and Chang, S.P. (2013). Global mass spectrometry based metabolomics profiling of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE* *8*, e60840.
- Sanz, L.M., Crespo, B., De-Cózar, C., Ding, X.C., Llergo, J.L., Burrows, J.N., García-Bustos, J.F., and Gamo, F.-J. (2012). *P. falciparum* *In Vitro* Killing Rates Allow to Discriminate between Different Antimalarial Mode-of-Action. *PLoS ONE* *7*, e30949.
- Straimer, J., Gnädig, N.F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Duru, V., Ramadani, A.P., Dacheux, M., Khim, N., Zhang, L., Lam, S., *et al.* (2015). Drug resistance. *K13-propeller* mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* *347*, 428–431.
- Teng, R., Junankar, P.R., Bubb, W.A., Rae, C., Mercier, P., and Kirk, K. (2009). Metabolite profiling of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum* by ¹H NMR spectroscopy. *NMR Biomed* *22*, 292–302.
- Teng, R., Lehane, A.M., Winterberg, M., Shafik, S.H., Summers, R.L., Martin, R.E., van Schalkwyk, D.A., Junankar, P.R., and Kirk, K. (2014). ¹H-NMR metabolite profiles of different strains of *Plasmodium falciparum*. *Biosci. Rep.* *34*, e00150.
- Terkuile, F., White, N.J., Holloway, P., Pasvol, G., and Krishna, S. (1993). *Plasmodium falciparum*: *In Vitro* Studies of the Pharmacodynamic Properties of Drugs Used for the Treatment of Severe Malaria. *Experimental Parasitology* *76*, 85–95.
- Thaithong, S., and Beale, G.H. (1981). Resistance of ten Thai isolates of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and pyrimethamine by *in vitro* tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *75*, 271–273.

- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., and Tada, K. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* *42*, 1530–1536.
- Vo Duy, S., Besteiro, S., Berry, L., Perigaud, C., Bressolle, F., Vial, H.J., and Lefebvre-Tournier, I. (2012). A quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry method for metabolomic analysis of *Plasmodium falciparum* lipid related metabolites. *Anal. Chim. Acta* *739*, 47–55.
- Wein, S., Maynadier, M., Tran Van Ba, C., Cerdan, R., Peyrottes, S., Fraisse, L., and Vial, H. (2010). Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 1651–1660.
- Wilson, D.W., Langer, C., Goodman, C.D., McFadden, G.I., and Beeson, J.G. (2013). Defining the Timing of Action of Antimalarial Drugs against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *57*, 1455–1467.
- Witkowski, B., Lelievre, J., Lopez Barragan, M.J., Laurent, V., Su, X. z., Berry, A., and Benoit-Vical, F. (2010). Increased Tolerance to Artemisinin in *Plasmodium falciparum* Is Mediated by a Quiescence Mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *54*, 1872–1877.
- Witkowski, B., Amaratunga, C., Khim, N., Sreng, S., Chim, P., Kim, S., Lim, P., Mao, S., Sopha, C., Sam, B., *et al.* (2013). Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *in-vitro* and *ex-vivo* drug-response studies. *The Lancet Infectious Diseases* *13*, 1043–1049.
- Yaffe, D. (1968). Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *61*, 477–483.

Chapitre 2

Exploration du mécanisme d'action du composé tête-de-série

Exploration du mécanisme d'action du composé tête-de-série

Nous avons vu dans la partie introductive que les flavonoïdes sont susceptibles de cibler différentes voies métaboliques chez *Plasmodium*. Après la caractérisation du profil pharmacologique du composé tête-de-série, il était important d'explorer son mécanisme d'action dans une perspective d'optimisation vers un candidat médicament.

Au cours de ce deuxième chapitre, nous précisons dans une première partie le comportement de MR27770 et de certains de ses analogues structuraux appartenant aux séries MR et LPI (représentés dans le rabat du quatrième de couverture). Ils seront évalués dans différents tests antiprotozoaires, seuls ou en association avec des antipaludiques de référence, mesurant leur phénotype vis-à-vis de *Plasmodium* mais également d'autres protozoaires Apicomplexes (*Babesia*, *Toxoplasma*) et Kinétoplastidés (*Leishmania*, *Trypanosoma*). Les résultats expérimentaux obtenus ont servi de pistes d'exploration des voies métaboliques à la recherche de mécanismes d'action potentiellement impliqués qui seront présentés dans une deuxième partie. Le recoupement des données de ces deux parties nous permettra de conclure ce chapitre.

A . Résultats obtenus par screening phénotypique

1 . Phénotype induit par MR27770

Le traitement d'une culture asynchrone de parasites par MR27770 induit un gonflement du parasite, à tous les stades de développement (**Figure 72**). Ce gonflement conduit à la lyse du parasite. En effet, une culture de *P. falciparum* ainsi traitée pendant 3 heures que l'on laisse ensuite évoluer normalement se débarrasse de ses parasites en quelques heures (seuls le noyau, d'apparence pycnotique, ou une vacuole résiduelle sont visibles au sein de l'hématie dans certains cas, **Figure 73**). Ce gonflement semble avoir lieu au sein de la vacuole digestive. MR27770 induit un effet similaire vis-à-vis de parasites synchronisés entre 0 et 3 heures juste après l'invasion de l'hématie (**Figure 73**). Or celle-ci n'est en principe pas encore formée au stade anneau jeune (Bakar *et al.*, 2010). Pourtant la présence de cristaux d'hémozoïne au sein de la vacuole aux stades plus âgés laisse à penser qu'il s'agit bien de la vacuole digestive. Deux hypothèses sont donc possible : (i) il ne s'agit pas de la vacuole digestive mais d'une vacuole proche dont la membrane n'est pas visible en microscopie optique et qui repousse les cristaux d'hémozoïne et la vacuole digestive ; (ii) le mécanisme d'action est différencié entre le stade anneau et les stades trophozoïte/schizonte, ce qui semble moins probable puisque le phénotype est le même.

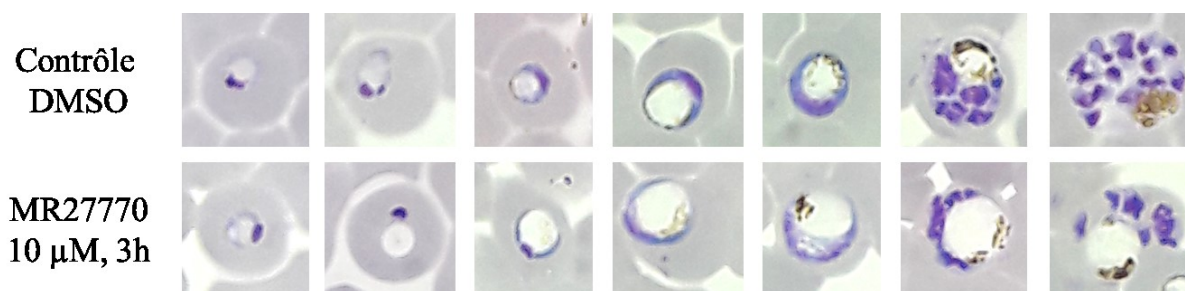


Figure 72. Phénotype induit après 3 heures de traitement d'une culture asynchrone par 10 µM de MR27770 ou par du milieu de culture contenant la même quantité de DMSO. Les différents stades de développement sont représentés (anneau, trophozoïte, schizonte). Le traitement par MR27770 induit un gonflement de ce qui semble être la vacuole digestive étant donné la présence de cristaux d'hémozoïne (en jaune) à partir du stade trophozoïte.

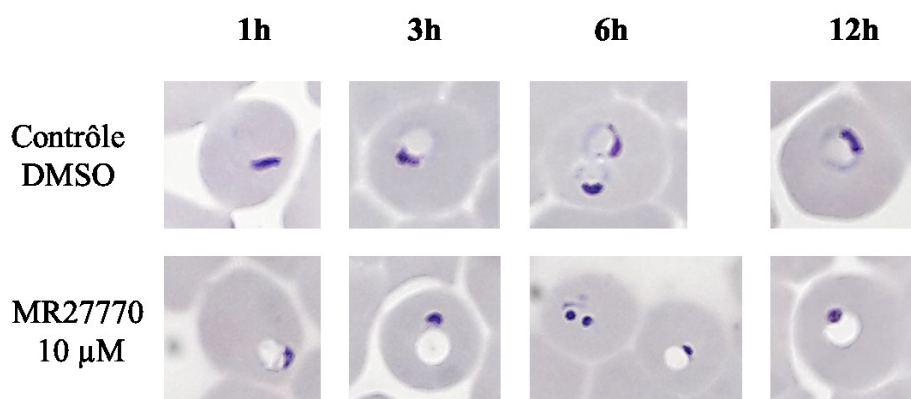


Figure 73. Phénotype observé en fonction du temps d'incubation d'anneaux âgés de 0 à 3 heures avec 10 µM de MR27770 ou avec du milieu de culture contenant la même quantité de DMSO. Le parasite gonfle puis semble éclater pour ne laisser qu'un noyau pycnotique résiduel au sein de l'hématie. La parasitémie diminue en fonction du temps, seuls les parasites résiduels sont visibles sur cette figure.

De plus, ce phénotype est observé également *in vivo* à J4 (MR27787, 2 x 100 mg/kg, **Figure 74**) et chez un autre apicomplexe hématozoaire en culture *in vitro* : *Babesia divergens* (MR27770 2 x CI₅₀, 72 heures d'incubation, **Figure 75**). Le phénotype est donc conservé entre les deux espèces de *Plasmodium* et les genres *Plasmodium* et *Babesia* suggérant que le mécanisme d'action est commun pour ces trois parasites.

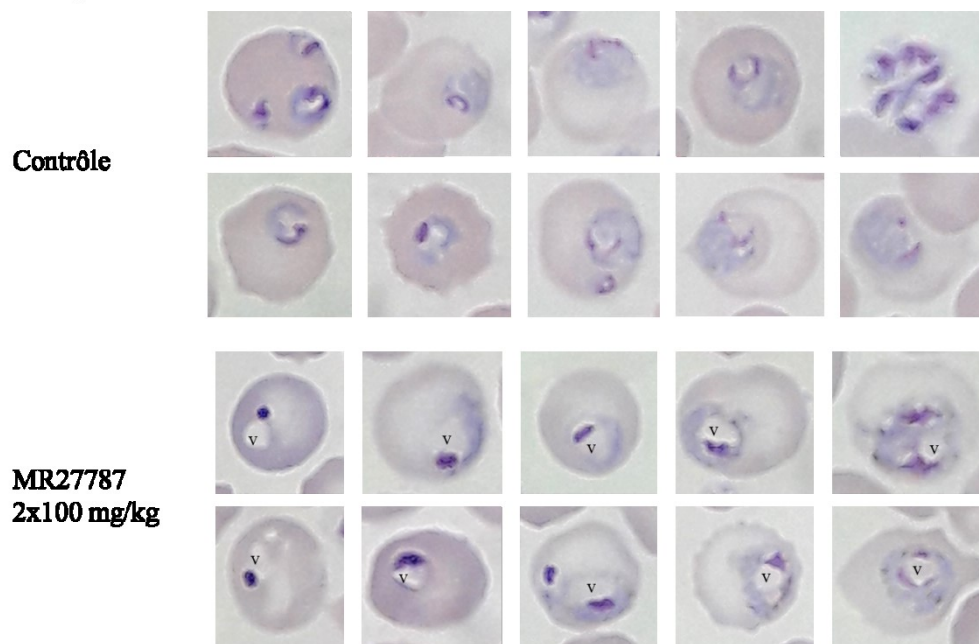
***P. berghei* ANKA, J4**

Figure 74. Phénotype observé à J4 sur les frottis de souris infectées par un *inoculum* de 2.10^6 *P. berghei* ANKA (J0) et traitées par deux doses de 100 mg/kg (J0, J1) de MR27787 ou par le solvant de dilution (CMC 1 %, contrôle). Tout comme pour *P. falciparum* *in vitro*, la formation d'une vacuole (v) est observée après traitement par les dérivés de la lanaroflavone et certains parasites présentent un noyau pycnotique.

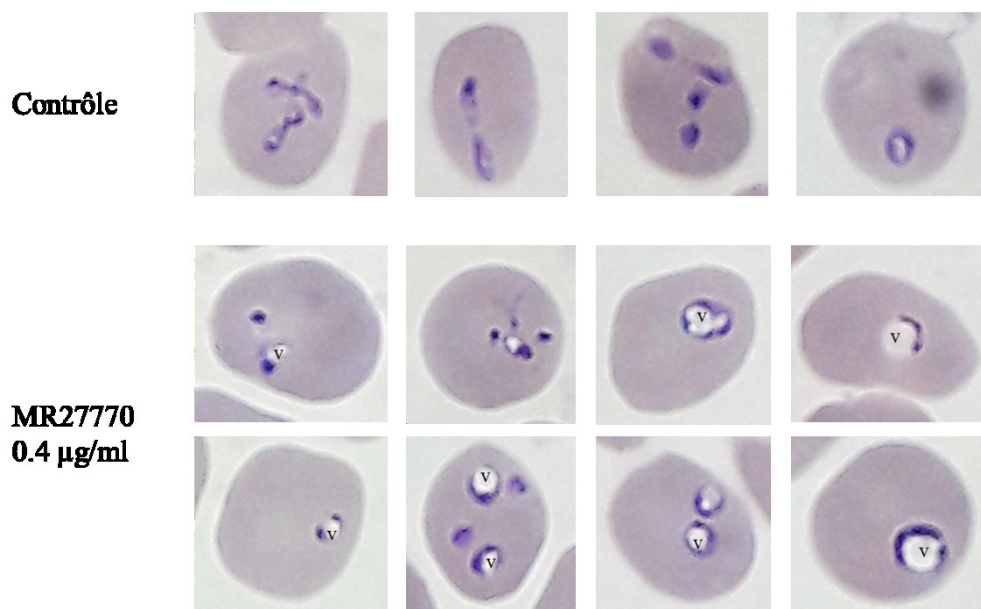
***Babesia divergens*, t=72h**

Figure 75. Phénotype observé après traitement d'une culture de *Babesia divergens* pendant 72 heures avec une concentration représentant environ $2 \times CI_{50}$ de MR27770. Les parasites contrôle se divisent normalement et présentent la morphologie caractéristique en croix de Malte. Sous traitement, le noyau se condense et une vacuole (v) se forme au sein du parasite.

P. berghei tout comme *Babesia* ne présentent pas de vacuole digestive clairement définie comme chez *P. falciparum* mais plutôt une multitude de petites vacuoles d'endocytose, la digestion de l'hémoglobine ayant lieu *in situ* (Guimarães *et al.*, 2003). La vacuole digestive ne semble donc ne pas être la cible des composés MR.

La rapidité d'action de MR27770 décrite dans le **Chapitre 1** (point C.2.iv) et les stades ciblés suggèrent un mécanisme indépendant d'une cible stade-spécifique ou d'un mécanisme nécessitant une exposition prolongée. De plus, le phénotype observé suggère un possible stress osmotique. Nous avons évalué s'il est exacerbé dans un milieu hyper- ou hypotonique. Pour cela, nous avons traité les parasites avec du PBS 1 x, 2,5 x ou 5 x concentré (10 % v/v, milieu hypertonique) ou avec 0 %, 25 % ou 50 % v/v d'eau milliQ stérile (milieu hypotonique) en présence ou en absence de 10 μ M de MR27770 (**Figures 76 à 79**).

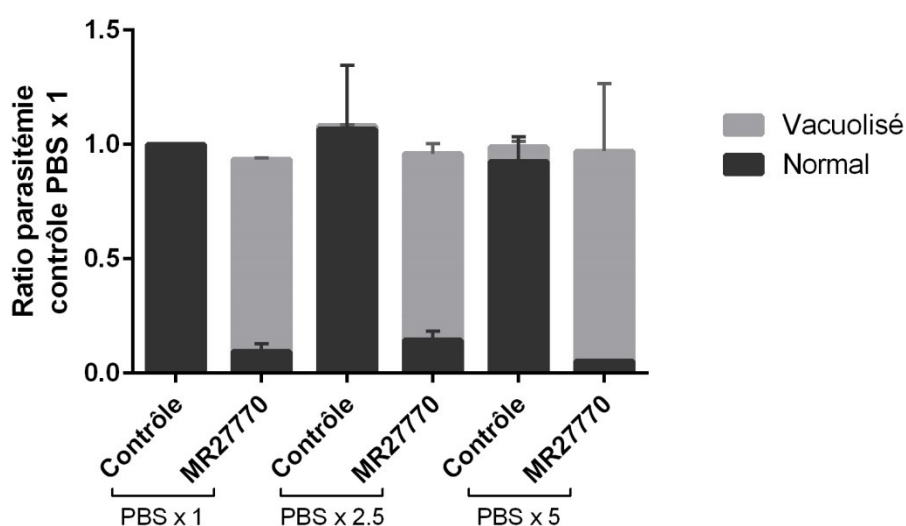


Figure 76. Parasitémie mesurée rapportée à celle du contrôle PBS x 1 après traitement de 3 heures en milieu hypertonique par du milieu de culture contenant 0,1 % de DMSO (contrôle) ou 10 μ M de MR27770. PBS 1 x, 2,5 x ou 5 x concentré (10 % v/v, milieu hypertonique)

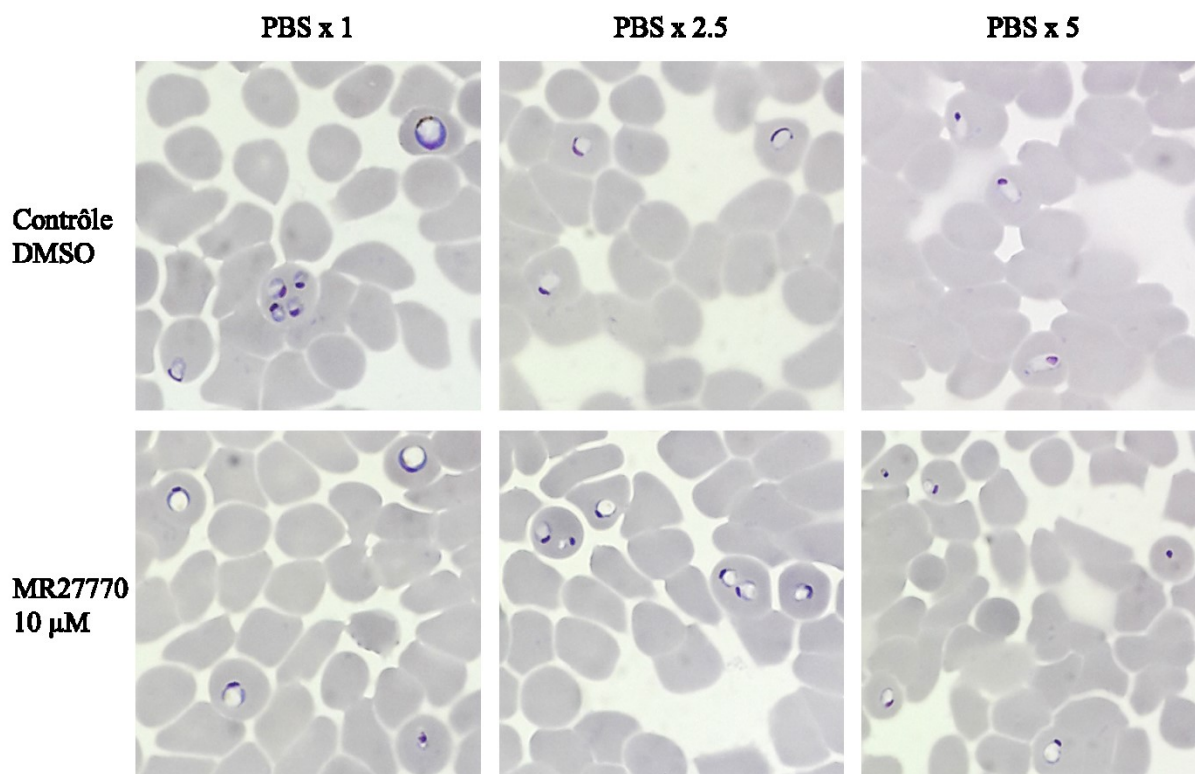


Figure 77. Phénotype observé après traitement de 3 heures en milieu hypertonique par du milieu de culture contenant 0,1% de DMSO (contrôle) ou 10 µM de MR27770. PBS 1 x, 2,5 x ou 5 x concentré (10 % v/v, milieu hypertonique)

La culture en milieu hyper-osmotique ne modifie pas le phénotype induit par MR27770 voire l'atténue légèrement. La parasitémie n'est pas modifiée et ce traitement n'a donc pas d'effet sur l'activité de MR27770.

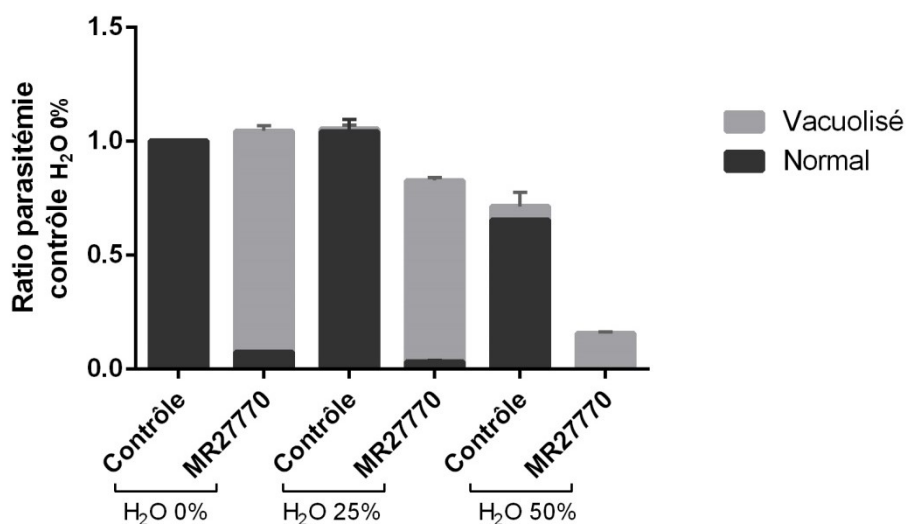


Figure 78. Parasitémie mesurée rapportée à celle du contrôle H₂O 0 % après traitement de 3 heures en milieu hypotonique par du milieu de culture contenant 0,1% de DMSO (contrôle) ou 10 µM de MR27770. H₂O 0 %, 25 % ou 50 % v/v, milieu hypotonique)

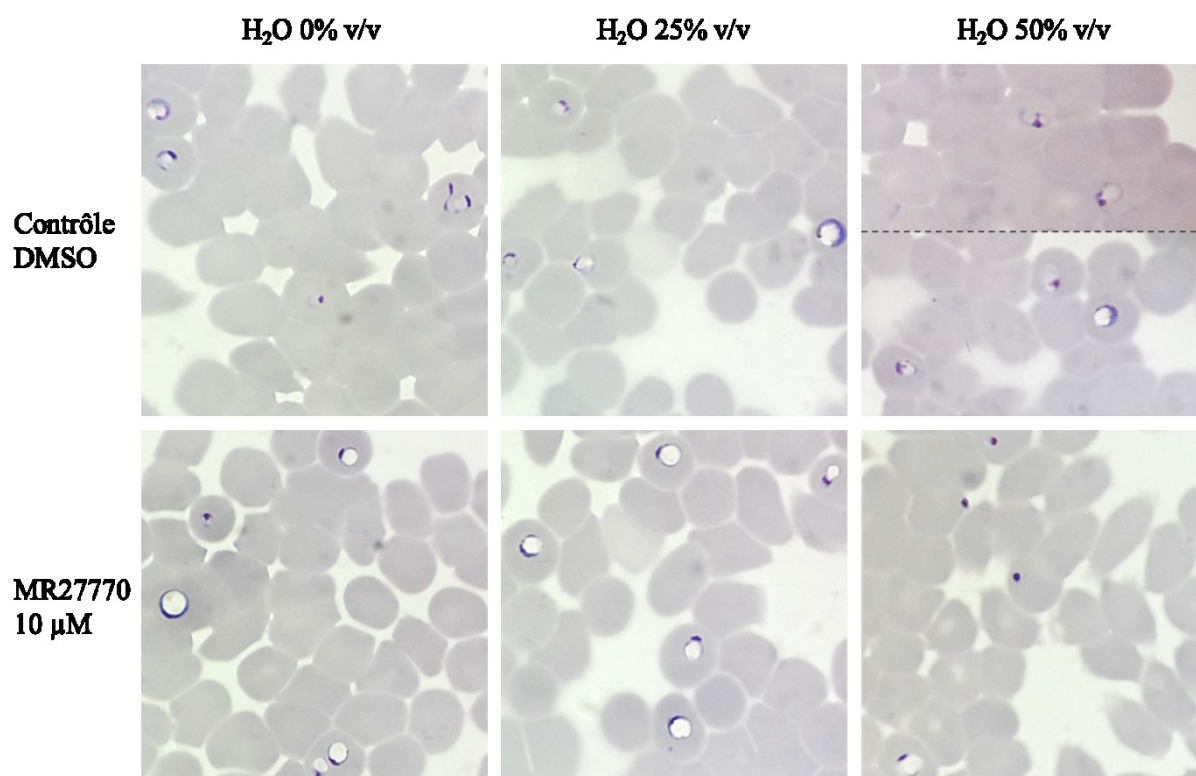


Figure 79. Phénotype observé après traitement de 3 heures en milieu hypotonique par du milieu de culture contenant 0,1 % de DMSO (contrôle) ou 10 μM de MR27770. H₂O 0 %, 25 % ou 50 % v/v, milieu hypotonique)

Au contraire, la culture en milieu hypotonique augmente la taille de la vacuole et fait éclater les parasites plus rapidement (**Figure 79**, noyaux résiduels et parasites hyper-gonflés à 50 % H₂O v/v), ce qui fait baisser la parasitémie de 84 % quand le milieu contient 50 % d'eau milliQ alors que la baisse n'est que de 30 % pour le contrôle traité dans les mêmes conditions (**Figure 78**).

Un afflux d'eau ou un efflux d'ions augmente donc l'effet de MR27770. Le mécanisme d'action pourrait ainsi impliquer un stress osmotique.

2. Inhibition du processus d'invasion

Pour affiner la caractérisation de l'effet de MR27770, nous avons évalué son impact sur le processus d'invasion. Etant donné que MR27770 exerce son effet tout au long du cycle et notamment au stade schizonte, nous avons dans un premier temps essayé de purifier des mérozoïtes. Malheureusement, et malgré plusieurs essais, nous n'avons pas réussi à obtenir suffisamment de mérozoïtes — dont la capacité à envahir l'hématie ne dure que 10 à 20 min — pour obtenir une parasitémie nous permettant de mesurer un effet. Nous avons donc purifié des schizontes segmentants que nous avons remis en culture avec des globules rouges sains, en présence ou en absence de MR27770 ou d'héparine 500 U. Nous avons également prétraité pendant 30 minutes (contrôle DMSO, héparine 500 U, MR27770 10 μM) puis lavé des globules rouges afin de savoir si le composé était retenu dans ce compartiment cellulaire et procédé de la même façon. Après 3 heures d'incubation, des frottis ont été réalisés et les

schizontes, anneaux et mérozoïtes ont été dénombrés sur 6000 hématies, de même que les anneaux vacuolisés (Figure 80).

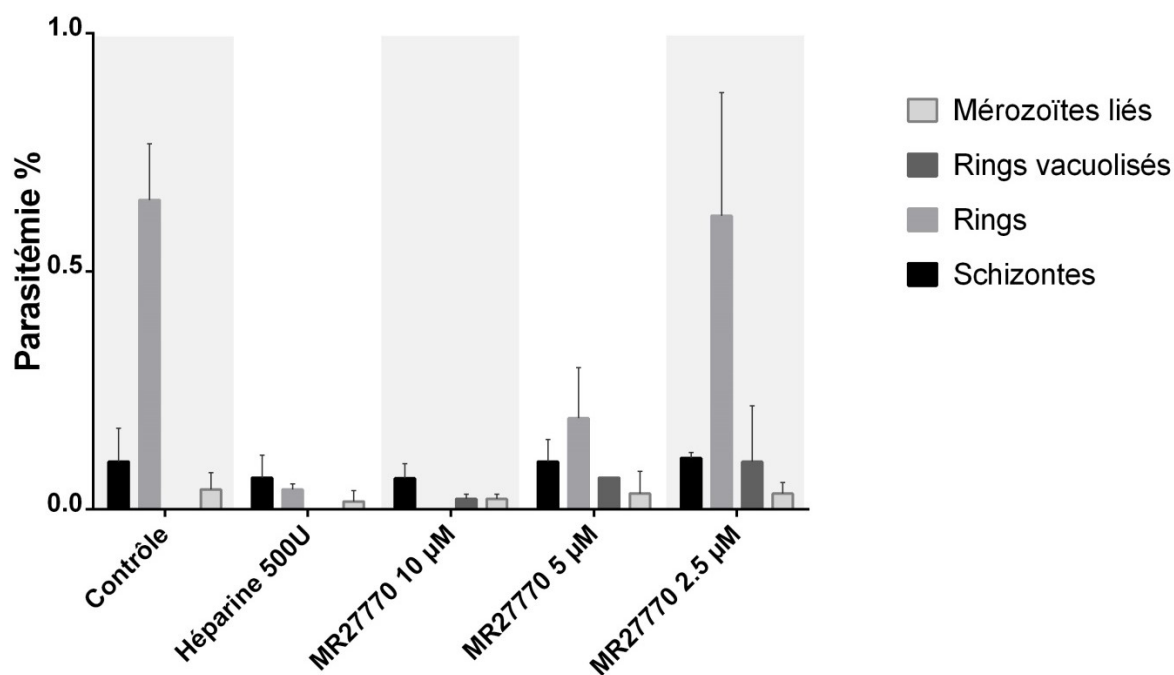


Figure 80. Pourcentage de globules rouges infectés par des schizontes résiduels, des anneaux (« rings » vacuolisés ou non) ou d'hématies où le mérozoïte est lié mais n'a pas encore envahi l'hématie. L'héparine, connue pour inhiber le processus d'invasion, est utilisée comme contrôle (n = 2).

Le traitement par héparine prévient l'invasion de nouvelles hématies étant donné que le nombre d'hématies infectées par des anneaux est réduit drastiquement sans que la morphologie des schizontes ne soit affectée. Étant donné que nous n'avons pas purifié de mérozoïtes, il n'est pas possible de prouver que l'effet de l'héparine n'est pas dû à une inhibition de l'éclatement du schizonte. Cependant, cela avait déjà été confirmé par l'équipe de Boyle *et al.* qui a montré que MSP-1 (*merozoite surface protein 1*) liait l'héparine et inhibait ainsi le phénomène d'invasion (Boyle *et al.*, 2010).

Le traitement par MR27770 réduit la formation d'anneaux de façon concentration-dépendante. Cependant, il est difficile de déduire que cet effet est uniquement dû à un impact sur l'invasion étant donné l'effet rapide de MR27770 et qu'il agit à tous les stades de développement du parasite, dont le stade schizonte. De plus, les schizontes présents sur les frottis étaient abîmés et présentaient soit un aspect fragmenté (Figure 81A), soit des noyaux condensés (Figure 81B), soit une « vacuole digestive » dont le volume était augmenté (Figure 81C), soit un gonflement du cytoplasme, une condensation de la chromatine et un rétrécissement (Figure 81D). L'effet semble donc essentiellement dû à un effet toxique vis-à-vis des schizontes. Un certain nombre d'anneaux ayant envahi les hématies présentaient une vacuolisation comme cela avait déjà été observé auparavant. La proportion d'anneaux vacuolisés est constante quelle que soit la concentration de MR27770 utilisée et représente environ 20 % du nombre total d'hématies parasitées. À 2,5 µM, certains anneaux présentent un cytoplasme

et/ou un noyau déformés, notamment certains où le noyau reste à la surface de l'hématie et où le cytoplasme traverse la cellule hôte, comme si l'invasion ne pouvait pas se finaliser (**Figure 81E**).

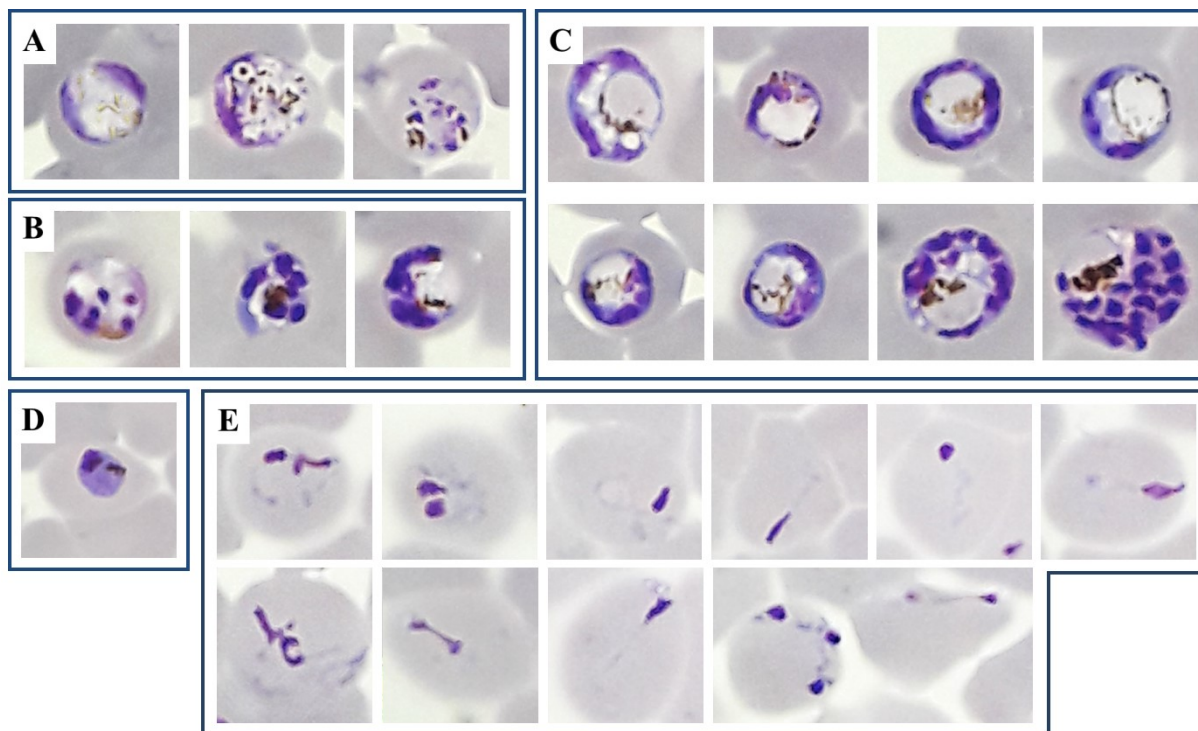


Figure 81. Phénotype observé lors de l'étude de l'effet de MR27770 lors du processus d'invasion. A. Schizontes ayant un aspect décoloré et fragmenté ; B. Schizontes présentant une condensation de la chromatine ; C. Schizontes présentant des vacuoles et une augmentation du volume de la vacuole digestive ; D. Schizonte présentant un gonflement du cytoplasme, une condensation de la chromatine et une diminution de taille ; E. Anneaux présentant un cytoplasme et/ou un noyau de forme anormale.

Quand les globules rouges sont prétraités puis lavés avant d'être mis en contact avec les schizontes, les résultats obtenus sont différents (**Figure 82**).

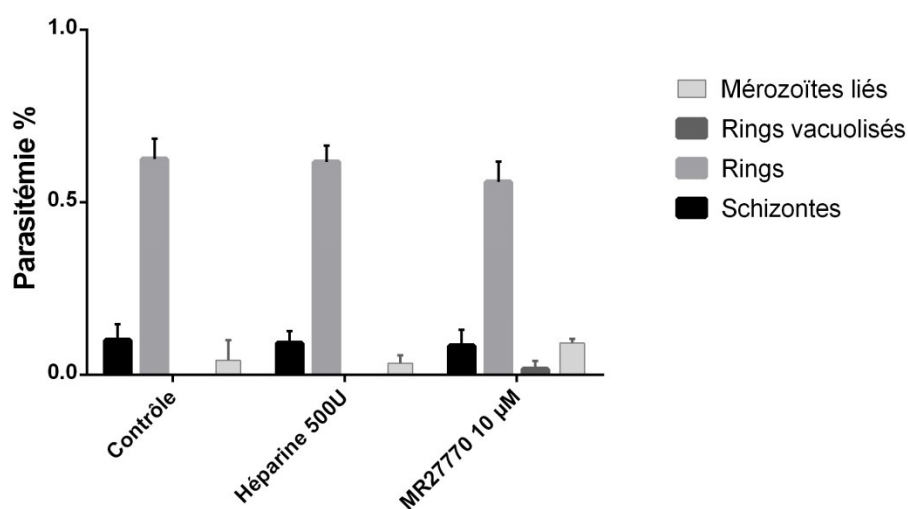


Figure 82. Pourcentage de globules rouges infectés par des schizontes résiduels, des anneaux (« rings » vacuolisés ou non) ou d'hématies où le mérozoïte est lié mais n'a pas encore envahi l'hématie. Les globules rouges ont été prétraités puis lavés avant l'ajout de schizontes purifiés et incubés pendant 3 heures avant la réalisation d'un frottis (n = 2).

Le contrôle DMSO présente le même profil que précédemment, mais l'héparine n'exerce plus son action. Cela s'explique facilement puisque l'héparine exerce son effet essentiellement en se fixant sur le parasite. Concernant MR27770, le prétraitement des hématies diminue légèrement la parasitémie par rapport au contrôle (8,0 +/- 5,6 %) mais cette différence n'est pas significative ($p = 0,6667$, test de Mann-Whitney). Quelques anneaux sont vacuolisés mais en proportion moindre que précédemment (3 %). Le prétraitement des globules rouges ne permet donc pas d'inhiber le phénomène d'invasion et une faible quantité de MR27770 semble persister au sein de l'hématie étant donné la présence de quelques anneaux vacuolisés.

3. Combinaison de drogues

L'effet de MR27770 a été évalué en combinaison avec des antipaludiques de différentes classes disponibles sur le marché par la technique des isobogrammes.

i. Combinaison MR27770/dihydroartémisinine

L'effet de la combinaison MR27770/dihydroartémisinine est clairement additif (ou indifférent). En effet, les points sont alignés sur la ligne qui relie les FIC de valeur 1, comme en témoigne la droite de régression dont l'équation est $Y = -0,9881 * X + 0,9897$ et dont le r^2 a une valeur de 0,9843. De plus, l'intervalle de confiance à 95 % de la droite de régression englobe la valeur 1 pour les variables X ($0,9214 < FIC_{MR27770} < 1,103$) et Y ($0,8992 < FIC_{DHA} < 1,080$).

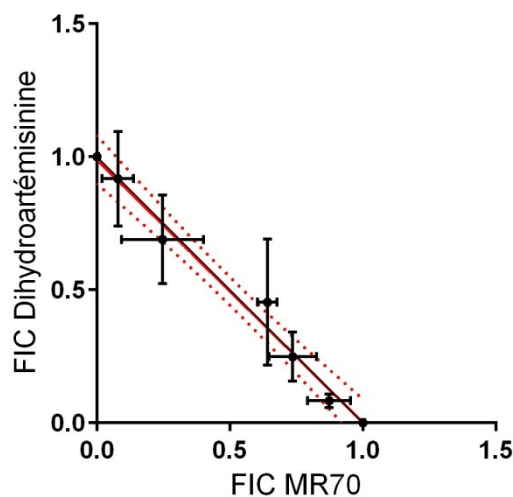


Figure 83. Isobogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et la dihydroartémisinine (n = 2). La droite rouge représente la droite de régression, les courbes rouges en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95 % de la droite obtenue. L'équation de la droite de régression est $Y = -0,9881 * X + 0,9897$, la droite est donc proche de 1 et l'effet de la combinaison est clairement additif (ou indifférent).

MR27770 n'interagit donc pas avec l'artémisinine.

ii . Combinaison MR27770/chloroquine

La relation MR27770-chloroquine est moins nette que pour l'artémisinine, et tend vers l'antagonisme. Mais étant donné que les écarts-types englobent pour la plupart la valeur 1 et que l'intervalle à 95 % des valeurs de la droite de régression englobent la valeur 1 ($1,016 < FIC_{MR27770} < 4,219$; $0,6495 < FIC_{CQ} < 1,568$), cet effet n'est statistiquement pas différent de la valeur 1 et donc d'un effet additif. MR27770 présente donc un effet additif avec la chloroquine, qui tend vers l'antagonisme.

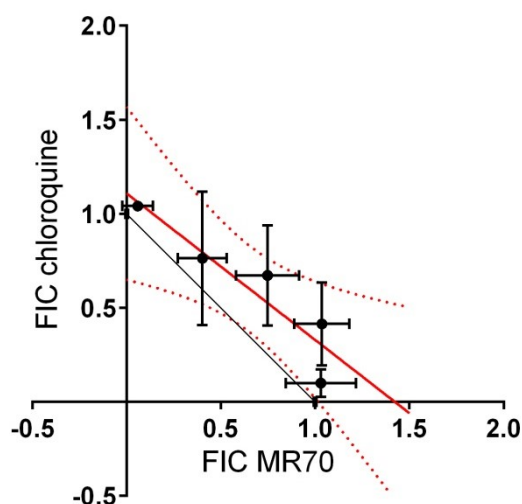


Figure 84. Isoblogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et la chloroquine (n = 2). La droite rouge représente la droite de régression, les courbes rouges en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95% de la droite obtenue. L'équation de la droite de régression est $Y = -0,7791 * X + 1,109$. Les intervalles de confiance à 95 % passant par la droite représentant l'effet additif (1), l'effet de la combinaison n'est pas statistiquement différent d'un effet additif mais tend vers l'antagonisme.

iii . Combinaison MR27770/méfloquine

Pour la méfloquine, l'effet est comparable aux données obtenues avec la chloroquine excepté que l'effet antagoniste est plus prononcé. En effet, les écarts-types se différencient de la droite représentant la valeur 1 et les intervalles de confiance à 95 % de la droite de régression sont différents de la valeur 1 ($1,120 < FIC_{MR27770} < 3,425$; $1,211 < FIC_{MQ} < 2,662$). L'effet est donc antagoniste avec la méfloquine.

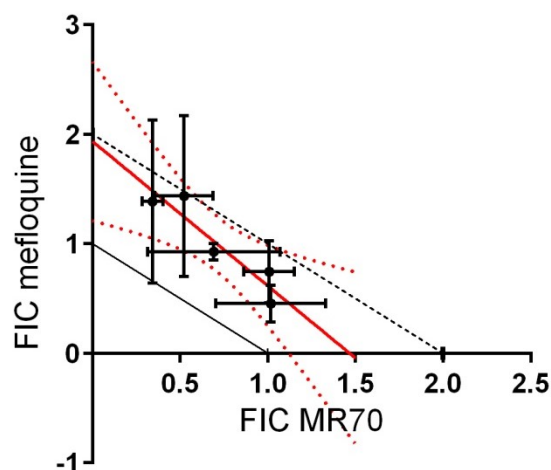


Figure 85. Isoblogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et la méfloquine ($n = 2$). La droite rouge représente la droite de régression, les courbes rouges en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95 % de la droite obtenue. L'équation de la droite de régression est $Y = -1,320 \cdot X + 1,936$. Les intervalles de confiance à 95 % ne passant pas par la droite représentant l'effet additif (1), l'effet de la combinaison est statistiquement différent d'un effet additif et est antagoniste.

iv . Combinaison MR27770/atovaquone

Il en est de même avec l'atovaquone, où tous les points sont regroupés au-dessus de la ligne délimitant l'effet additif (1 ; 1). L'effet est donc antagoniste.

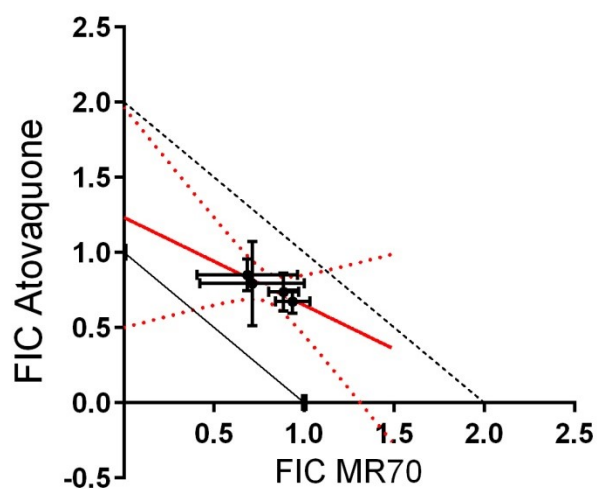


Figure 86. Isoblogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et l'atovaquone ($n = 4$). La droite rouge représente la droite de régression, les courbes rouges en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95 % de la droite obtenue. Les intervalles de confiance à 95 % ne passant pas par la droite représentant l'effet additif (1) dans la zone où les points sont regroupés, l'effet de la combinaison est statistiquement différent d'un effet additif et est antagoniste.

v. Combinaison MR27770/pyriméthamine

Concernant la pyriméthamine, l'effet est additif pour certaines combinaisons et semble tendre vers l'antagonisme à d'autres. Etant donné l'allure des points, l'interpolation de la droite de régression n'a pas de sens dans ce cas.

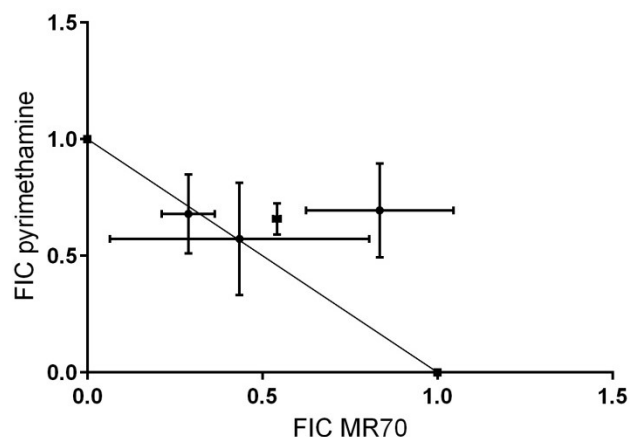


Figure 87. Isoblogramme obtenu pour l'interaction entre MR27770 et la pyriméthamine (n = 2). L'effet est additif pour certaines combinaisons et antagoniste pour d'autres.

4. Activité vis-à-vis des stades hépatiques (modèle murin, coll. D. Mazier)

L'activité de MR27770 et de son dérivé LPI3363 (représenté dans le rabat du quatrième de couverture) a été évaluée sur un modèle murin d'infection hépatique par l'équipe du Professeur Dominique Mazier (CIMI, Paris). Deux modèles ont été évalués, *P. yoelii* dans des cellules HepG2CD81 et *P. berghei* dans des hépatocytes primaires de singe. Le nombre et la taille des parasites ont été évalués.

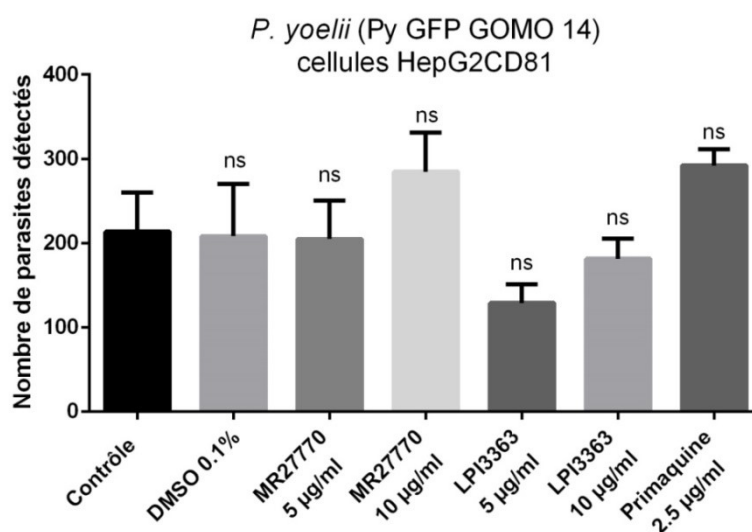
i. Modèle *P. yoelii*/cellules HepG2CD81

Figure 88. Nombre de parasites *P. yoelii* détectés par cellule HepG2CD81 infectée en fonction du traitement appliqué. ns = différence non significative par rapport au contrôle DMSO. La différence contrôle DMSO-contrôle n'est pas significative (test de Student). (Collab. Pr D. Mazier, CIMI, Paris)

Les composés MR27770 et LPI3363, tout comme la primaquine utilisée en contrôle, ne permettent pas de réduire significativement le nombre de parasites détectés (**Figure 88**).

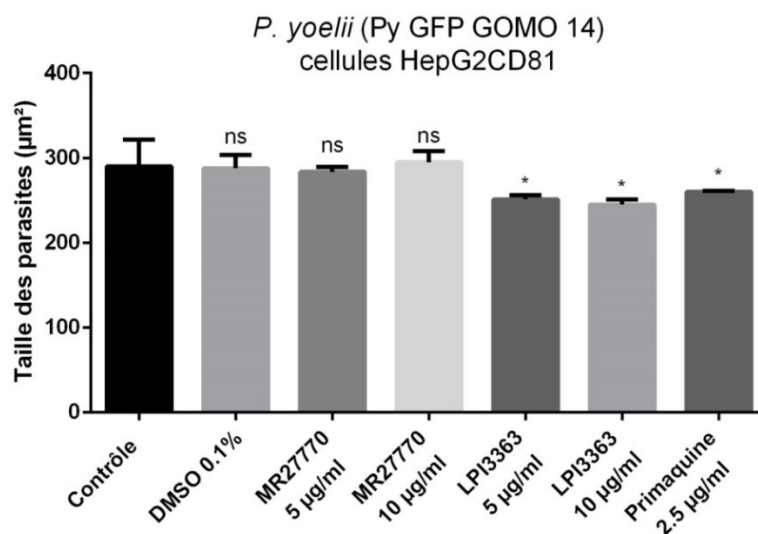


Figure 89. Taille des parasites *P. yoelii* infectant des cellules HepG2CD81 en fonction du traitement appliqué. ns = différence non significative par rapport au contrôle DMSO. La différence contrôle DMSO-contrôle n'est pas significative, LPI3363 5 µg/ml $p = 0,0035$; LPI3363 10 µg/ml $p = 0,013$; Primaquine 2,5 µg/ml $p = 0,0158$ (test de Student). (Collab. Pr D. Mazier, CIMI, Paris)

Concernant la taille moyenne des parasites (**Figure 89**), LPI3363 à 5 et 10 µg/ml et la primaquine diminuent légèrement ce paramètre ($p = 0,0035$; 0,013 et 0,0158 respectivement vs contrôle DMSO, test de Student). MR27770 et LPI3363 ne présentent donc pas d'activité notable dans ce modèle aux concentrations utilisées.

ii . Modèle *P. berghei*/hépatocytes primaires de singe

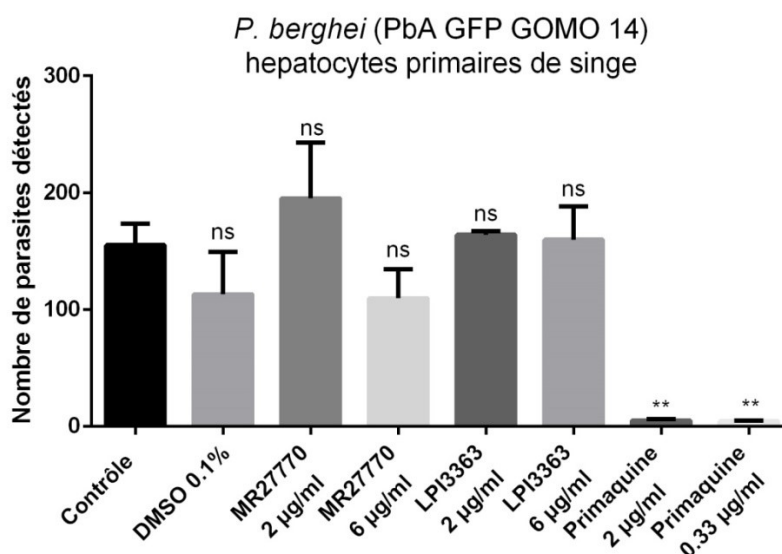


Figure 90. Nombre de parasites *P. berghei* détectés par hépatocyte primaire de singe *Macaca fascicularis* infecté en fonction du traitement appliqué. ns = différence non significative par rapport au contrôle DMSO. La différence contrôle DMSO-contrôle n'est pas significative, Primaquine 2 et 0,33 µg/ml $p = 0,0068$ (test de Student). (Collab. Pr D. Mazier, CIMI, Paris)

Dans le modèle *P. berghei* infectant des hépatocytes primaires de singe, comme attendu, la primaquine est efficace ($p = 0,0068$ vs contrôle DMSO, test de Student) mais les composés MR27770 et LPI3363 ne montrent toujours pas d'activité à la concentration maximale de 6 $\mu\text{g/ml}$ (environ 12 μM , **Figure 90**).

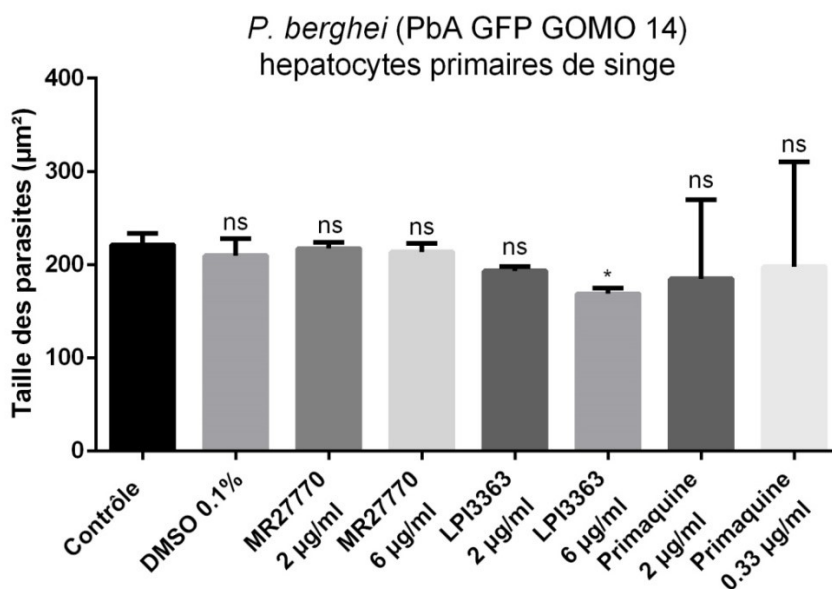


Figure 91. Taille des parasites *P. berghei* infectant des hépatocytes primaires de singe *Macaca fascicularis* en fonction du traitement appliqué. ns = différence non significative par rapport au contrôle DMSO. La différence contrôle DMSO-contrôle n'est pas significative, LPI3363 6 $\mu\text{g/ml}$ $p = 0,0195$ (test de Student). (Collab. Pr D. Mazier, CIMI, Paris)

A nouveau, la taille des parasites est légèrement diminuée à 6 $\mu\text{g/ml}$ pour le composé LPI3363 ($p = 0,0195$, test de Student, **Figure 91**).

Les deux composés évalués ne présentent donc pas d'activité notable dans les deux modèles étudiés. L'activité sera prochainement évaluée vis-à-vis d'hépatocytes infectés par *P. falciparum* afin de s'assurer que l'absence d'effet n'est pas due à l'espèce de parasite.

5. Effet sur d'autres parasites protozoaires

Certains composés ont été évalués vis-à-vis de kinétoplastidés (*Trypanosoma brucei rhodesiense* et *Leishmania donovani*, collaboration Swiss TPHI, **Tableau 11**) et d'autres Apicomplexes (*Toxoplasma gondii*, *Babesia divergens*, **Tableau 12**).

i. Activités mesurées vis-à-vis des Kinétoplastidés

Tableau 11. Activités mesurées vis-à-vis de trypomastigotes de *Trypanosoma brucei rhodesiense* STIB900, d'amastigotes axéniques de *Leishmania donovani*, d'une culture asynchrone de stades sanguins de *Plasmodium falciparum* K1 et de cellules L6 pour cinq dérivés MR (Collab. M. Kaiser, Swiss Tropical and Public Health Institute).

composé	MW	CI ₅₀ (µM)							
		<i>T.b.rhodesiense</i> trypomastigotes		<i>L.donovani</i> amastigotes axéniques		<i>P.falciparum</i> K1		Cytotoxicité L6	
		moyenne	Ecart- type	moyenne	Ecart- type	moyenne	Ecart- type	moyenne	Ecart- type
Melarsoprol	398,3	0,006	0,002						
Miltefosine	407,6			0,236	0,010				
Chloroquine	515,9					0,222	0,007		
Podophyllotoxine	414,4							0,016	0,002
MR31571	393,43	0,094	0,058	17,551	1,492	0,919	0,376	41,812	8,088
MR31572	393,43	0,333	0,133	15,352	1,258	0,845	0,340	40,160	19,770
MR31573	369,16	0,638	0,105	39,549	4,980	2,233	0,285	17,960	3,103
MR31574	369,41	2,925	0,381	76,338	69,292	2,639	0,402	28,018	0,191
MR31575	383,44	1,000	0,260	30,813	14,698	1,912	0,280	32,730	3,135

Certains des composés MR testés présentent des activités submicromolaires vis-à-vis de *T. brucei*, activités qui sont 1 à 10 fois supérieures à celles mesurées sur *Plasmodium*. Le composé le plus actif, MR31571, a été évalué *in vivo* sur un modèle de trypanosomiase aigüe (souris NMRI infectées par 1.10^4 *T.b.rhodesiense* STIB900) mais ne présentait pas d'activité à 4 x 50 mg/kg i.p.

L'activité mesurée sur les amastigotes de *Leishmania* en culture axénique est faible et proche, voire supérieure dans certains cas, à l'activité cytotoxique vis-à-vis de cellules L6.

ii. Activités mesurées vis-à-vis des Apicomplexes

L'activité de MR27770, MR27787 et MR31571 a été évaluée vis-à-vis de *Toxoplasma gondii* (souche RH $\Delta ku80$, YFP, luc) en culture sur cellules MRC-5. Les activités mesurées ne se différencient pas de la toxicité observée vis-à-vis des cellules de mammifères (observation microscopique pour les cellules MRC-5 et CI₅₀ pour des fibroblastes humains en culture primaire pNHDF), les dérivés MR évalués ne présentent donc pas d'activité sélective vis-à-vis de *Toxoplasma* (Tableau 12).

Tableau 12. Activités mesurées vis-à-vis de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* RH-*Aku80*-YFP-luc, de trophozoïtes de *Babesia divergens*, de stades sanguins de *Plasmodium falciparum* 7G8 et de fibroblastes humains en culture primaire (pNHDF) pour trois dérivés MR.

composé	MW	CI ₅₀ (μM)							
		<i>T. gondii</i> tachyzoïtes		<i>Babesia divergens</i>		<i>P.falciparum</i> 7G8		Cytotoxicité pNHDF	
		moyenne	Ecart-type	moyenne	Ecart-type	moyenne	Ecart-type	moyenne	Ecart-type
MR27770	423,4	> 77	/	0,35	0,2	2,1	0,9	> 77	/
MR27787	469,5	> 2,6	/	1,4	0,2	0,9	-	2,7	1,8
MR31571	393,4	> 28	/	2,6	0,01	1,6	0,02	17,1	2,0
Atovaquone	366,8	nd	nd	0,03	0,02	nd	nd	Nd	nd

MR27770 présente une activité plus importante vis-à-vis de *Babesia divergens* que de *P. falciparum*. Ce composé n'a pas pu être évalué *in vivo* faute de modèle disponible au laboratoire (*Babesia microti*). La pyriméthamine et l'artésunate n'ont pas ou peu d'effet sur *Babesia* (36 et 11 % d'inhibition respectivement à 1 μg/ml) ce qui renforce l'idée que le mécanisme d'action des dérivés de la lanaroflavone est différent de ces deux classes chimiques.

MR27770 et son dérivé 3'-déméthoxylé MR31571 présentent donc une activité vis-à-vis 3 parasites hématozoaires (*P. falciparum*, *B. divergens* et *T. brucei*) dont deux sont des parasites intracellulaires. Le mécanisme d'action pourrait être conservé d'un genre à l'autre étant donné que le phénotype observé (vacuole gonflée) était identique chez *Babesia* et *Plasmodium* (Chapitre 2, partie B.1). La même observation n'a pas pu être mise en oeuvre pour *T. brucei* car le test de viabilité correspondant est externalisé (Bâle, Swiss TPH). Le fait que ces composés ne présentent pas de sélectivité vis-à-vis de parasites de cellules nucléées, *T. gondii* et *L. donovani*, et ne présentent pas d'activité vis-à-vis des stades hépatiques de *Plasmodium* pourrait indiquer que le mécanisme d'action implique la présence du parasite dans le sang.

B . Voies métaboliques et mécanismes investigués

1 . Effet sur la digestion de l'hémoglobine

Etant donné que l'activité de flavonoïdes vis-à-vis des protéases dégradant l'hémoglobine a été mise en évidence (Jin *et al.*, 2014) et que l'inhibition des enzymes de cette voie induit un phénotype similaire à celui provoqué par MR27770, à savoir un gonflement de la vacuole digestive par accumulation d'hémoglobine ou de peptides non dégradés (Prasad *et al.*, 2013), nous avons évalué si MR27770 impactait la dégradation de l'hémoglobine. Pour cela nous avons réalisé un extrait protéique total d'une culture de *Plasmodium* au stade trophozoïte et lysé des globules rouges sains dont le surnageant contient de grandes quantités d'hémoglobine. Nous avons ainsi mis en contact l'extrait

protéique (qui contient la plasmepsine II et la falcipaine-2 responsables de la dégradation de la globine en peptides) et le lysat de globules rouges contenant l'hémoglobine en présence et en absence de MR27770 à 10 ou 100 μM . La même quantité de chaque mélange a ensuite été séparée sur gel SDS-PAGE, ultérieurement coloré au bleu de Coomassie (**Figure 92**).

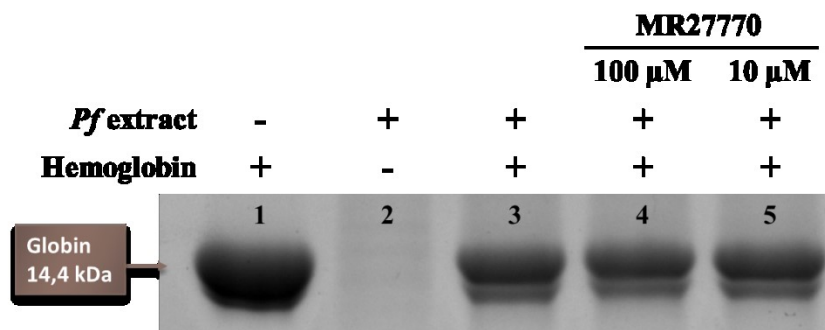


Figure 92. Mélange protéique de *Plasmodium* et d'hémoglobine en présence ou en absence de MR27770. Le marqueur de taille a permis de mettre en évidence la tache de chaîne de globine ayant migré à 14.4 kDa. Puits 1 : hémoglobine seule ; puits 2 : extrait protéique seul ; puits 3 : extrait protéique + hémoglobine ; puits 4 : extrait protéique + hémoglobine + MR27770 à 100 μM ; puits 5 : extrait protéique + hémoglobine + MR27770 à 10 μM . Le premier puits contient la même quantité d'hémoglobine initiale que les puits 3, 4 et 5. De même, le puits 2 contient la même quantité de protéines de *Plasmodium* que les puits 3, 4 et 5. Le puits 2 contenant uniquement l'extrait protéique ne contient pas de tache à 14,4 kDa, ce qui confirme que la purification des protéines parasites a été bien réalisée. La présence d'une quantité diminuée de globine dans le puits 3 indique que la digestion de l'hémoglobine a bien eu lieu.

La quantité de globine lysée par l'extrait protéique de *P. falciparum* contenant les enzymes de dégradation de l'hémoglobine est identique en présence ou en absence de MR27770 (puits 4 et 5, traités par MR27770). Cela indique clairement que MR27770 n'inhibe pas la première étape de la dégradation de l'hémoglobine. N'ayant pas de contrôle positif au moment où cette manipulation a été réalisée, cette expérience sera réitérée en utilisant la pepstatine A, peptidomimétique inhibant la plasmepsine II.

2 . *New Permeability Pathways (NPP)*

Les dérivés de chalcone étant capables d'inhiber la lyse induite par le sorbitol en bloquant des canaux anioniques exportés à la membrane du globule rouge (Go *et al.*, 2004; Silfen *et al.*, 1988; Sisodia *et al.*, 2012), nous avons évalué si cet effet était conservé pour les flavones. Nous avons évalué la capacité de quatre dérivés simplifiés de la lanaroflavone, dont MR27770, à bloquer ces canaux, essentiels à la survie du parasite pour l'import de nutriments et l'export de déchets métaboliques. Nous avons utilisé le furosémide comme contrôle positif et la chloroquine, qui n'est pas connue pour avoir un tel effet, en tant que contrôle négatif (**Figure 93**).

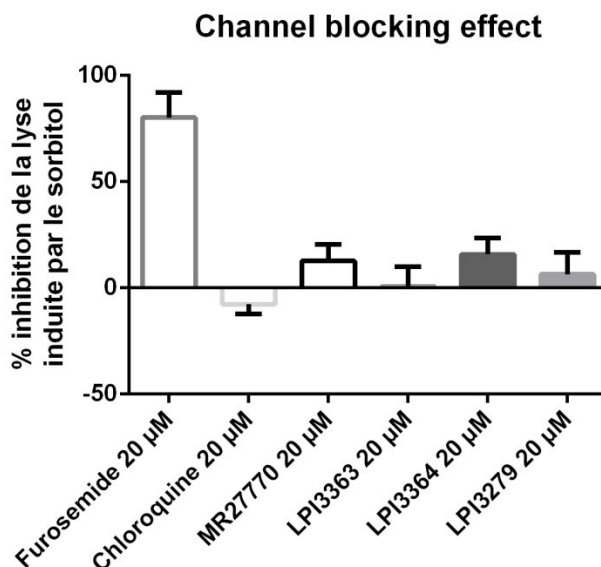


Figure 93. Inhibition de la lyse induite par le sorbitol par quelques dérivés de la lanaroflavone. Contrôle positif : Furosémide, contrôle négatif : Chloroquine. Concentration testée : 20 µM (n = 4 manipulations indépendantes).

Le contrôle positif furosémide, appartenant à la classe des diurétiques de l'anse car il inhibe les canaux chlorure, présente un effet bloqueur des canaux anioniques des NPP de 80.1 +/- 11.9 % à 20 µM. La chloroquine n'a pas d'effet, voire augmente légèrement la lyse due au sorbitol. Les dérivés de la lanaroflavone ne présentent que peu, voire pas d'effet (0,7 à 15,8 % d'inhibition) à la concentration de 20 µM, l'inhibition des canaux anioniques exportés par le parasite à la membrane du globule rouge n'explique donc pas l'effet de ces dérivés.

3. Activité mesurée vis-à-vis de kinases humaines, de *Plasmodium* et de *Leishmania* (Collaboration L. Meijer, Station Biologique de Roscoff)

Les kinases sont des protéines qui partagent un mécanisme commun de phosphorylation des protéines. Elles sont impliquées dans de nombreux processus biologiques et leur dérégulation est liée à de nombreuses pathologies comme les cancers ou les maladies inflammatoires. Les flavones sont connues pour inhiber les kinases et ont été beaucoup étudiées vis-à-vis de cette classe de protéines (Singh *et al.*, 2014). C'est notamment le cas du flavopiridol, flavone synthétique substituée en position 8 actuellement en développement pour le traitement de différents types de carcinomes [inhibiteur de cdk (*cyclin-dependent kinases*)].

L'activité des premiers dérivés MR a donc été évaluée en collaboration avec le Dr Laurent Meijer (Station Biologique de Roscoff) vis-à-vis de différentes kinases à leur disposition : 5 kinases humaines (DYRK1A, *dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A* ; CLK1, *CDC like kinase 1* ; CK1, *casein kinase 1* ; GSK-3, *glycogen synthase kinase 3* ; CDK5, *cyclin-dependent kinase 5*), une kinase de *Leishmania major* (LmCK1) et une kinase de *P. falciparum* (PfGSK-3).

Tableau 13. Activité de certains dérivés MR vis-à-vis de kinases humaines, de *Leishmania* et de *Plasmodium*. (Collab. L. Meijer, Station Biologique, Roscoff)

Composé	Activité résiduelle %						
	DYRK1A	CLK1	CK1	LmCK1	GSK-3	PfGSK-3	CDK5
MR27784	75 ± 19	67 ± 29	100 ± 14	88 ± 34	95 ± 2	79 ± 4	81 ± 2
MR27785	90 ± 13	79 ± 2	85 ± 23	70 ± 4	66 ± 10	64 ± 10	96 ± 12
MR27786	99 ± 12	81 ± 4	90 ± 9	77 ± 17	97 ± 7	86 ± 5	88 ± 35
MR27787	113 ± 16	78 ± 5	96 ± 5	85 ± 25	81 ± 7	87 ± 6	82 ± 9
MR27794	86 ± 2	61 ± 15	88 ± 5	53 ± 18	62 ± 1	76 ± 14	87 ± 5
MR27795	84 ± 5	48 ± 2	85 ± 15	80 ± 12	64 ± 9	79 ± 7	87 ± 9
MR27797	80 ± 8	98 ± 12	103 ± 15	123 ± 11	92 ± 6	102 ± 7	79 ± 8

Les dérivés MR n'inhibent pas les kinases humaines ou celles des protozoaires, la CI_{50} des composés les plus actifs MR27794 et 95 étant de l'ordre de 10 μ M pour les enzymes *LmCK1* et *CLK1*, respectivement. Le site actif des kinases (site liant l'ATP) étant hautement conservé dans cette famille de protéines, l'action des inhibiteurs est rarement sélective au sein de cette famille. Nous pouvons donc extrapoler de ces résultats qu'il est peu probable qu'une kinase soit impliquée dans le mécanisme d'action des dérivés de la lanaroflavone.

4. Inhibition de la voie de synthèse des isoprénoïdes (MEP) ou de la prénylation des protéines

La prénylation des protéines est un processus indispensable au bon fonctionnement de la cellule et contrôle l'activité et la localisation des protéines cibles. Le rôle des protéines prénylées est largement conservé, montrant l'importance biologique de cette modification lipidique (Wang and Casey, 2016). Les isoprénoïdes sont synthétisés uniquement *via* la voie du mévalonate dans la cellule animale. Dans les cellules végétales, la voie du mévalonate est impliquée mais c'est préférentiellement la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) qui sert à la prénylation des protéines. Chez *Plasmodium*, tout comme chez les autres apicomplexes présentant un plaste relictuel, l'apicoplaste, seule la voie du MEP a été conservée. Cibler la voie de synthèse des isoprénoïdes est donc une approche intéressante pour cibler sélectivement *Plasmodium* étant donné que cette voie est différente de celle présente dans les cellules animales.

Nous avons eu accès à un modèle de screening phénotypique permettant de mettre en évidence des inhibiteurs de la voie du MEP ou de l'enzyme responsable de la prénylation des protéines (prényl-transférase). Nous avons pu évaluer l'effet de MR27770 dans ce modèle. Les tests ont été réalisés au sein de l'équipe *Metabolic Network* de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP), en collaboration avec Andréa Hemmerlin. Ce modèle fait appel à des cellules de tabac BY-2 transformées qui expriment la calmoduline de riz couplée à la GFP. Cette protéine a été choisie car elle présente un motif d'adressage nucléaire en plus d'un site de prénylation (motif CAAX). Dans le cas où la protéine

est prénylée, elle est exportée à la membrane plasmique, dans le cas contraire (inhibition de la voie du MEP ou de la prényl-transférase) la protéine est adressée au noyau. L'observation en microscopie confocale du phénotype induit (fluorescence au niveau de la membrane ou du noyau) permet donc de mettre en évidence l'effet inhibiteur (noyau) ou l'absence d'effet (membrane) des composés évalués. Afin que ce phénotype ne soit exprimé que lorsque l'on traite les cellules, l'expression du gène codant pour la calmoduline-GFP est sous le contrôle d'un promoteur inductible à la dexaméthasone, qui est ajoutée après 3 heures d'incubation avec les composés à tester (**Figure 94**).

Cellules BY-2 de tabac transformées
Promoteur inductible à la dexaméthasone :
Expression du gène uniquement en présence de DEX

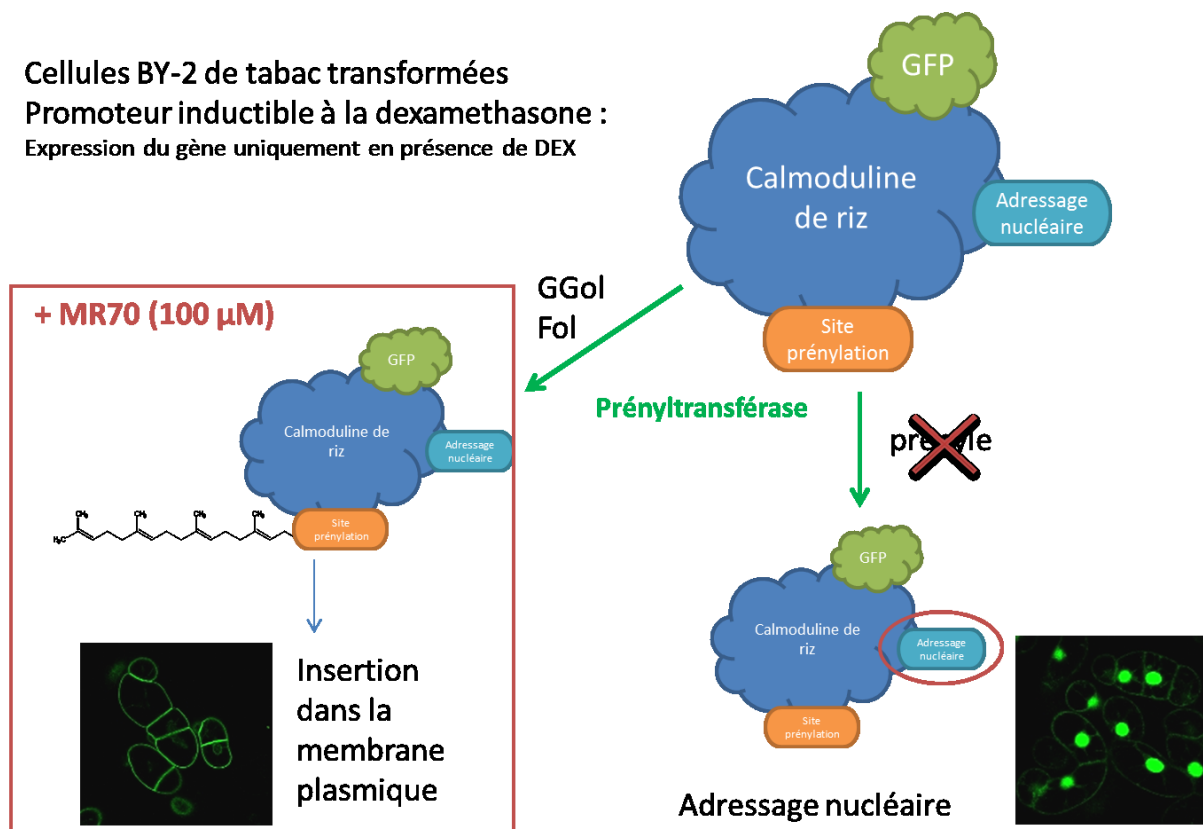


Figure 94. Principe du screening phénotypique permettant de mettre en évidence des inhibiteurs de la voie du MEP ou de la prényl-transférase et résultats obtenus pour MR27770 testé à 100 μM . GGol = géranylgeraniol (prényl en C_{20}), Fol = Farnésol (prényl en C_{15}), DEX = dexaméthasone.

MR27770 a été évalué à 100 μM dans ce modèle et présentait une fluorescence au niveau de la membrane plasmique. MR27770 n'inhibe donc pas la voie du MEP, du moins dans un modèle végétal.

C . Conclusion

En conclusion de ce chapitre, les dérivés de flavone du projet présentent plusieurs caractéristiques qui nous permettent de mieux appréhender le mécanisme d'action.

Ils induisent un phénotype conservé dans plusieurs espèces (*P. falciparum*, *P. berghei*) et plusieurs genres d'Apicomplexes (*B. divergens*). Ce phénotype se définit par l'induction d'une vacuole au sein du parasite et ce, quel que soit le stade de développement intra-érythrocytaire impliqué. Le parasite

gonfle jusqu'à son éclatement comme en témoigne la présence de noyaux relictuels au sein de l'hématie. Cette vacuolisation semble avoir lieu au sein de la vacuole digestive de *P. falciparum* à partir du stade trophozoïte, ce qui ne devrait pas être le cas au stade anneau, chez *P. berghei* et chez *B. divergens* étant donné que la vacuole digestive n'est pas présente aux stades précoces chez *P. falciparum* ou chez les deux autres parasites.

Ce phénomène pourrait être dû à un stress osmotique impliquant un afflux d'eau ou un efflux d'ions car la culture en milieu hypertonique (mimé par différentes concentrations de PBS) ne modifie pas la parasitémie et le phénotype induit par MR27770, alors qu'un milieu hypotonique (mimé par différentes proportions d'eau milliQ) induit une accentuation du phénotype et une forte diminution de la parasitémie liée à l'éclatement plus rapide des parasites.

MR27770 ne semble pas avoir d'effet sur l'invasion bien que cela devrait être confirmé par l'isolement de mérozoïtes, puisque MR27770 est actif tout au long du cycle et notamment sur le stade schizonte. Néanmoins, ce composé perturbe cette étape étant donné la présence d'anneaux présentant un cytoplasme anormal dans les cultures traitées par de faibles doses de MR27770. De plus, le globule rouge sain ne sert pas de réservoir de MR27770 étant donné que les parasites ayant envahi l'hématie ne sont que peu affectés par le prétraitement des globules rouges sains par MR27770 (3 % d'anneaux vacuolisés).

La combinaison de MR27770 avec les antipaludiques classiques montre un effet nettement additif avec la dihydroartémisinine alors qu'une tendance à l'antagonisme est présente pour la chloroquine, la méfloquine et l'atovaquone. L'interaction avec la pyriméthamine est entre les deux effets, semblant additive dans certains cas et antagoniste dans d'autres.

MR27770 et son dérivé LPI3363 ne présentent pas d'activité vis-à-vis des stades hépatiques aux concentrations testées, bien que ce dernier ait une légère tendance à réduire la taille des parasites. L'effet semble donc spécifique des stades sanguins. Cette conclusion est étayée par le fait que les dérivés évalués présentent des activités marquées vis-à-vis des parasites hématozoaires *Plasmodium*, *Babesia* et *Trypanosoma brucei* alors qu'ils ne présentent pas de sélectivité vis-à-vis des parasites des cellules nucléées *Leishmania* et *Toxoplasma*. Le mécanisme d'action, s'il est conservé entre les trois parasites hématozoaires, ne semble donc pas impliquer la cellule hôte (*Trypanosoma brucei* étant un parasite circulant librement dans le sang), ni la vacuole parasitophore, *Babesia* désintégrant rapidement cette membrane après son entrée dans la cellule hôte.

Enfin, l'effet de MR27770 n'implique pas les protéases dégradant la globine, ne bloque pas les canaux anioniques des *new permeability pathways* impliqués dans l'absorption non spécifique de nutriments et d'anions et ne semble pas cibler de kinases ni la voie de biosynthèse des isoprénoides. La synthèse

de dérivés fluorescents de MR27770 est en cours afin de préciser la localisation cellulaire du composé et donc de sa potentielle cible.

Bibliographie du chapitre 2

- Bakar, N.A., Klonis, N., Hanssen, E., Chan, C., and Tilley, L. (2010). Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Cell Science* 123, 441–450.
- Boyle, M.J., Richards, J.S., Gilson, P.R., Chai, W., and Beeson, J.G. (2010). Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood* 115, 4559–4568.
- Go, M.-L., Liu, M., Wilairat, P., Rosenthal, P.J., Saliba, K.J., and Kirk, K. (2004). Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol-induced hemolysis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3241–3245.
- Guimarães, A.M., Lima, J.D., and Ribeiro, M.F.B. (2003). Ultrastructure of *Babesia equi* trophozoites isolated in Minas Gerais, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 23.
- Jin, H., Xu, Z., Cui, K., Zhang, T., Lu, W., and Huang, J. (2014). Dietary flavonoids fisetin and myricetin: dual inhibitors of *Plasmodium falciparum* falcipain-2 and plasmepsin II. *Fitoterapia* 94, 55–61.
- Prasad, R., Atul, null, Kolla, V.K., Legac, J., Singhal, N., Navale, R., Rosenthal, P.J., and Sijwali, P.S. (2013). Blocking *Plasmodium falciparum* development via dual inhibition of hemoglobin degradation and the ubiquitin proteasome system by MG132. *PLoS ONE* 8, e73530.
- Silfen, J., Yanai, P., and Cabantchik, Z.I. (1988). Bioflavonoid effects on *in vitro* cultures of *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology* 37, 4269–4276.
- Singh, M., Kaur, M., and Silakari, O. (2014). Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry. *Eur J Med Chem* 84, 206–239.
- Sisodia, B.S., Negi, A.S., Darokar, M.P., Dwivedi, U.N., and Khanuja, S.P.S. (2012). Antiplasmodial activity of steroidal chalcones: evaluation of their effect on hemozoin synthesis and the new permeation pathway of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte membrane: Antiplasmodial activity of steroidal chalcones. *Chemical Biology & Drug Design* 79, 610–615.
- Wang, M., and Casey, P.J. (2016). Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 110–122.

Chapitre 3

Etude de type relation structure-activité

Etude de type Relation Structure-Activité

A . Introduction

Ce chapitre porte sur l'étude de relation structure activité et présentera l'analyse des résultats obtenus pour les différentes séries d'analogues de la lanaroflavone. Cette étude a été menée en collaboration avec les pharmacochimistes de l'UMR 7200 (M. Schmitt, P. Wagner) et du CERMN de Caen (V. Collot, S. Stiebing). Dans un premier temps, les résultats obtenus autour de la série 3',4'-diméthoxy dont le chef de file est MR27770 seront exposés, ils comprendront notamment l'évaluation de l'importance des méthoxy sur les cycles A et B, et l'évaluation de l'importance de la liaison alcyne et de l'azote en position 8. Dans une deuxième partie, une série de flavones substituées en position 7 sera présentée ainsi que la série 4'-O-benzyle. Enfin, les propriétés pharmacologiques de certains analogues améliorés seront présentées dans une dernière partie.

Nous avons vu lors de la présentation du contexte de la thèse que l'étude préliminaire de RSA a permis de mettre en évidence l'importance du pont éther entre les positions 8 et 4'', ces positions ont donc été choisies comme base de travail. La lanaroflavone étant constituée de deux unités apigénine, il y a deux façons de considérer la molécule : soit comme une apigénine substituée en 8, soit comme une apigénine substituée en 4' (**Figure 95**). Ainsi, la stratégie de l'étude de RSA choisie a pour point de départ une unité apigénine décorée en positions 8 et 4' afin de mimer la fraction de la structure initiale qui semblait essentielle à l'activité, tout en réduisant sa masse moléculaire. L'activité de la lanaroflavone bien que sub-micromolaire reste néanmoins modeste pour une activité antiplasmodiale *in vitro*. Ce sont l'originalité du châssis moléculaire peu exploré dans les positions d'intérêt et le potentiel de pharmacomodulation qui nous ont poussés à nous en servir comme point de départ d'une étude de RSA.

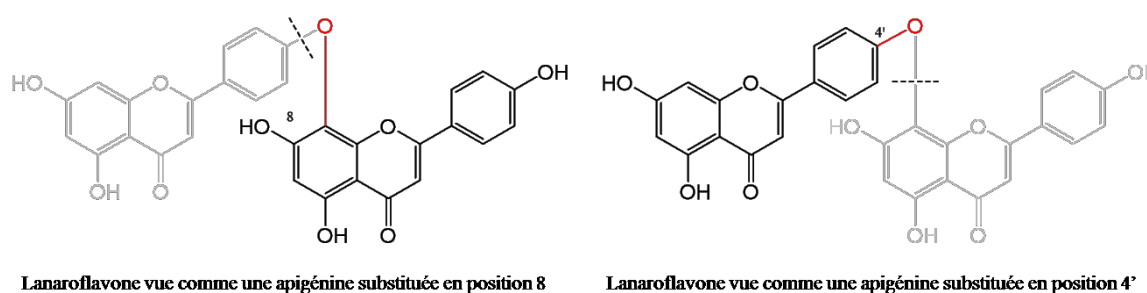


Figure 95. Schéma représentant les deux façons de considérer la lanaroflavone (biapigénine) : apigénine substituée en 8 ou apigénine substituée en 4'

Les données de la littérature indiquent que plus le nombre de groupements méthoxyles dans la structure des biflavonoïdes présentant une liaison interflavonique de type C-C est élevé, plus l'activité antiplasmodiale est augmentée d'une part (Weniger *et al.*, 2006) et plus la stabilité métabolique vis-à-

vis de la flore commensale du tube digestif est augmentée d'autre part (Griffiths and Smith, 1972). En plus des substitutions en positions 8 et 4', l'unité apigénine de départ a donc été polyméthoxylée et dans tous les cas protégée au niveau des hydroxyles présents. Deux séries chimiques comprenant des liaisons C-C en position 8 ont été conçues et structurent l'étude de RSA présentée ci-après (le pont éther étant, selon notre hypothèse, la source de l'instabilité métabolique de la lanaroflavone) :

- la première simplification envisagée a été de remplacer le pont éther engageant les carbones 8 et 4'' par une liaison C-C plus courte (comme dans les structures des biapigénines inactives, la cupressuflavone et l'amentoflavone) et de réduire la seconde unité apigénine en position 8 à un noyau benzène diversement substitué. Elle fait intervenir une réaction pallado-catalysée de Suzuki impliquant un précurseur iodé en position 8 et un groupement protecteur O-benzyle en position 4' (**Figure 96**). Cette simplification a donné lieu à la série O-benzylée (**Tableau 22**).
- dans un deuxième temps, une seconde stratégie de synthèse permettant de mimer plus justement la longueur du pont éther a été mise au point. Elle fait intervenir une réaction pallado-catalysée de Sonogashira (chaîne carbonnée) ou de Suzuki (aromatique) impliquant le même précurseur iodé polyméthoxylé (**Figure 96**). Cette stratégie a conduit à l'obtention de la série 3',4'-di-O-méthyle dont MR27770 est le chef-de-file (**Tableaux 15 à 20**).
- Enfin, une série de flavones synthétiques sélectionnées dans la chimiothèque du CERMN à Caen ainsi que certains dérivés réalisés par la suite ont aussi été évalués pour leurs propriétés antipaludiques (**Tableau 21**), elles sont substituées en position 7.

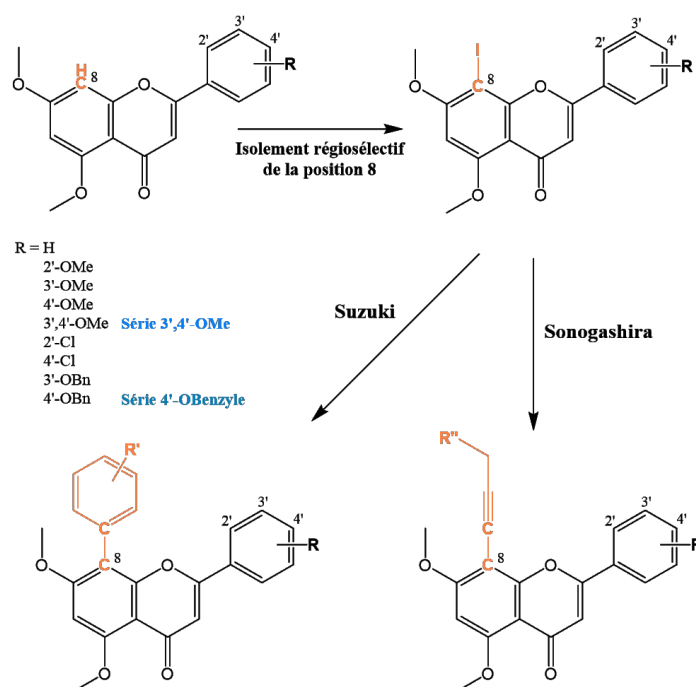


Figure 96. Schéma réactionnel mettant en jeu un précurseur iodé permettant d'obtenir les flavones substituées en position 8

Ainsi, 83 dérivés ont été synthétisés jusqu'à présent. Les seules flavones synthétiques décrites présentant une liaison C-C en position 8 ont été décrites récemment par Helgren *et al.* et ont été évoquées précédemment (Helgren *et al.*, 2015).

B . Stratégie employée

La CI_{50} de chaque composé a été mesurée *in vitro* sur deux souches de *P. falciparum* via deux tests différents :

- la souche K1, employée au Swiss THPI de Bâle, est multi-résistante [chloroquine, pyriméthamine, cycloguanil et sulfadoxine (Thaithong and Beale, 1981)] ; sa division est évaluée en utilisant le test d'incorporation de l'hypoxanthine tritiée, test de référence ;
- la souche 7G8, utilisée à l'IPPTS, est multi-résistante [chloroquine, la pyriméthamine et au cycloguanil (Burkot *et al.*, 1984)] ; sa viabilité est évaluée via un kit ELISA qui permet de détecter la pLDH sécrétée par le parasite.

L'intérêt de combiner les deux techniques est que l'on mesure deux paramètres différents. Le test hypoxanthine permet de mesurer l'impact du composé sur la division parasitaire tandis que le test ELISA pLDH permet de déterminer l'impact sur la survie du parasite. Cependant, les CI_{50} obtenues peuvent être discordantes étant donné que la pLDH a une demi-vie d'environ 1,5 jour, ce qui est long par rapport à une incubation de 72 heures. Selon Wein *et al.*, le test hypoxanthine est le plus fiable car il permet de mettre en évidence des composés qui ont un profil d'action différent de l'existant et qui n'auraient pas été sélectionnés *via* un autre test (Wein *et al.*, 2010).

En parallèle, la cytotoxicité a été évaluée sur des cultures cellulaires transformées (L6, Hepa-1.6, ThP1) et primaires (pNHDF) selon deux tests faisant appel à la réduction intracellulaire d'un réactif coloré (WST-8) ou fluorescent (resazurine) en cas de viabilité. La mesure de la cytotoxicité nous permet de déterminer un indice de sélectivité (IS) pour chaque molécule testée qui est égal au rapport de la valeur de la CI_{50} de la cytotoxicité observée rapportée à celle de l'activité anti-*Plasmodium*. Plus la valeur de l'indice de sélectivité est importante, plus l'activité anti-*Plasmodium* est sélective. Dans les essais d'activité antiparasitaire sur les protozoaires, on estime classiquement qu'un $IS > 10$ est le signe que l'activité antipaludique observée n'est pas due à une toxicité cellulaire générale, donc spécifique.

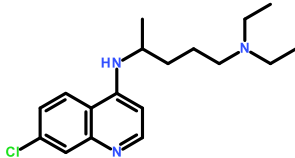
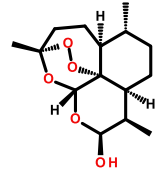
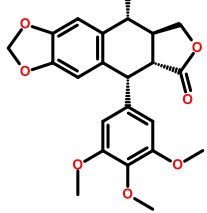
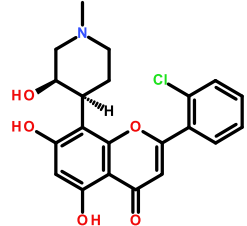
Les composés les plus actifs et les moins cytotoxiques ($CI_{50} \leq 1 \mu M$, $IS > 10$) sont évalués *in vivo* sur un modèle murin (souris Swiss mâles infectées par *P. berghei* ANKA, inoculât de 2.10^6 parasites) en suivant le protocole des 4 jours décrit par Peter (1999). La parasitémie des souris est mesurée après administration de 4 doses de 50 mg/kg, voire 100 mg/kg en cas d'inactivité, par voie intrapéritonéale et orale.

Le LogD (coefficient de partage octanol/eau) a été déterminé à pH 7,4 pour les composés les plus actifs ou pour confirmer l'amélioration de la solubilité suite à certaines modifications chimiques ; il est calculé à partir de la mesure expérimentale du CHI.

C . Composés de référence

Quatre composés de référence ont été évalués : les antipaludiques chloroquine et dihydroartémisinine et les anticancéreux podophyllotoxine et flavopiridol, ce dernier étant une flavone substituée en position 8 actuellement en développement pour le traitement de différents types de carcinomes [inhibiteur de cdk (*cyclin-dependent kinases*)]. Nous avons jugé intéressant d'évaluer l'activité antipaludique du flavopiridol et les activités cytotoxiques de la chloroquine et la dihydroartémisinine afin d'avoir un élément de comparaison. Les activités des composés utilisés en tant que référence sont présentées dans le **Tableau 14**.

Tableau 14. Activités antipaludiques et cytotoxiques des composés de référence. CQ-diP = chloroquine diphosphate, DHA = dihydroartémisinine, Pdtx = podophyllotoxine.

code composé	Structure	MW g/mol	<i>In vitro</i>						<i>In vivo</i>
			<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ +/- SD μM		Cytotoxicité CI ₅₀ +/- SD μM			% inhibition à J4	
			K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1	<i>P. berghei</i> ANKA
CQ-diP		516	0.108 (0.003)	0.165 (0.045)	nd	47.5 (10.2)	93.3 (29.2)	35.0 (19.6)	100% (25 mg/kg)
DHA		284	nd	0.004 (0.001)	nd	3.7 (2.9)	> 35	0.65 (0.37)	nd
Pdtx		414	nd	nd	0.020 (0.003)	nd	nd	nd	/
flavopiridol		438	2.25 (1.72)	6.51 (3.05)	0.141 (0.009)	0.108 (0.033)	> 2.3	0.045 (0.003)	/

Comme nous pouvons nous y attendre, la chloroquine présente une CI_{50} supérieure à 60 nM sur les deux souches multirésistantes de *P. falciparum* (K1 et 7G8) alors que la dihydroartémisinine conserve une activité de l'ordre du nanomolaire. La chloroquine a été utilisée comme référence pour les évaluations *in vivo* et s'avère totalement efficace à la dose de 4 x 25 mg/kg.

Le flavopiridol présente une activité modérée sur *Plasmodium*, avec des indices de sélectivité inférieurs à 1 ce qui confirme son activité cytotoxique marquée. Les fibroblastes en culture primaire (pNHDF) sont là encore, comme attendu, moins sensibles que les autres types cellulaires (lignées cancéreuses) à l'action toxique des composés. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules primaires se divisent plus lentement que les cellules transformées et l'inhibition de croissance est donc moins visible sur une période de 72 heures, mais également dans le cas du flavopiridol parce qu'elles ne sur-expriment pas les kinases carcinogènes ciblées par le composé (Sedlacek, 2001).

D . Analogues synthétiques simplifiés de la lanaroflavone

Pour faciliter la lecture du manuscrit, les analogues les plus prometteurs et les séries évaluées sont rappelées dans le rabat en quatrième de couverture.

1 . Série 3',4'-di-O-méthylée

Comme cela a été évoqué au **Chapitre 1**, MR27770 le premier intermédiaire de synthèse obtenu et à l'origine de cette série, présente un groupement diméthylaminopropyle en position 8 car la triple liaison nécessaire à la réaction de Sonogashira devait être saturée dans un second temps. Cet intermédiaire, évalué *in vitro* avant la saturation de la triple liaison, bien que modestement actif possédait des propriétés physicochimiques appropriées pour éprouver nos hypothèses d'activité *in vivo*. En effet, MR27770 présentait une activité très moyenne sur les deux souches de *Plasmodium* ($CI_{50} \approx 2 \mu\text{M}$) mais possédait des propriétés de solubilité accrue par rapport aux composés prometteurs de la série 4'-O-benzylée ($\text{LogD}_{7.4} = 2.59$). Le parti pris a été de se servir d'un composé modestement actif *in vitro* mais potentiellement biodisponible *in vivo* pour tenter d'établir notre preuve de concept chez l'animal.

Ce pari s'est avéré fructueux puisque le composé s'est avéré partiellement actif chez la souris à la dose de 100 mg/kg, nous permettant d'en faire la première preuve de concept *in vivo* attendue (35.5 % +/- 34.3 % d'inhibition de la parasitémie à J4 et 49.7 % +/- 21.4 % à J5). Le choix de la dose a été guidé par la valeur moyenne de CI_{50} mesurée *in vitro*.

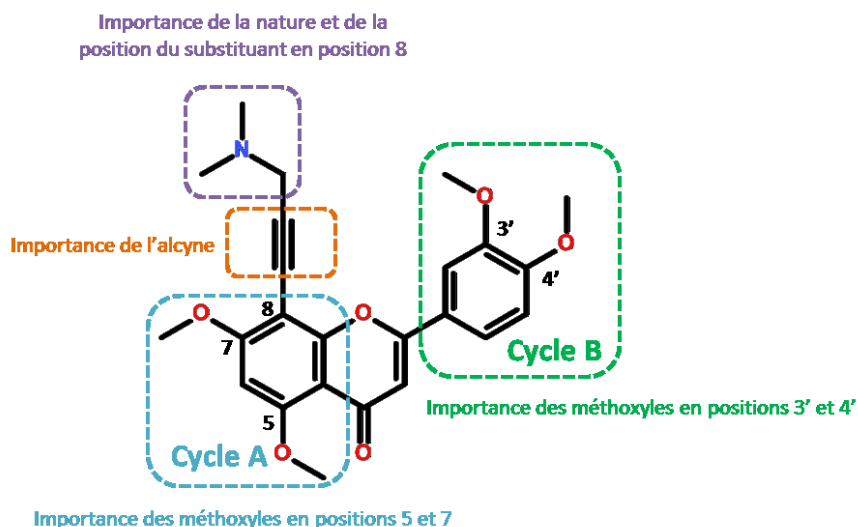


Figure 97. Etude topologique autour du composé MR27770

Afin d'améliorer cette activité, une étude topologique a été mise en place autour de ce composé (**Figure 97**) afin de **i)** de réduire le nombre de groupements méthoxyles qui contribuent à la lipophilie de la molécule et qui sont susceptibles d'augmenter son élimination *in vivo* ; **ii)** d'évaluer l'importance de la position et de la nature du substituant en position 8 ; **iii)** de remplacer l'alcyne en position 8, synonyme de toxicité.

i. Importance des méthoxyles sur le cycle B

Dans un premier temps l'importance des deux groupements méthoxyles en positions 3' et 4' du cycle B a été évaluée. Les résultats obtenus pour cette série de composés sont répertoriés dans le **Tableau 15**.

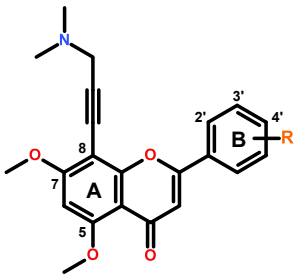
La substitution du cycle B en position 3' et 4' augmente l'activité antipaludique, au moins pour la souche 7G8, et ne modifie pas la cytotoxicité (MR27770, #1 vs cycle nu, #2). La substitution par un méthoxyle en 2' (#3), 3' (#4) ou 4' (#5) ne modifie pas vraiment l'activité antipaludique par rapport au composé 3',4'-diméthylé (#1), mais a tendance à augmenter la toxicité, notamment vis-à-vis des cellules en culture primaire (pNHDF) pour le composé #5 (tous les composés n'ont pas pu être évalués dû à la croissance limitée des cellules en culture primaire).

Le remplacement du méthoxyle des composés #3 et #5 par un atome de chlore ne modifie pas l'activité en position 2' (#6) et augmente légèrement l'activité en position 4' (#24) mais augmente la toxicité d'un facteur 10 par rapport au composé méthoxylé correspondant (cellules L6).

La présence d'un groupement O-benzyle en position 3' ou 4' augmente l'activité mais également la toxicité, les composés étant peu sélectifs. Le déplacement du O-benzyle de la position 4' (MR27787, #9) vers la position 3' (#8) tend à augmenter l'activité et à limiter la toxicité. Cependant le gain d'activité antipaludique peut être lié au fait que le composé #8 a été synthétisé sous forme de sel et est

plus soluble, comme en témoignent les $\text{LogD}_{7,4}$ mesurés. La substitution de la position 3' semble néanmoins limiter la toxicité aspécifique, (composé 3',4'-diméthoxylé #1 *versus* 4'-monométhoxylé #5, Composé 3'-O-benzylé #8 *versus* 4'-O-benzylé #9). Il est donc légitime de se demander si l'ajout d'un 3'-méthoxy au composé MR27787 (#9) pourrait limiter la toxicité due au 4'-O-benzyle — mais induirait également une augmentation de sa nature lipophile, déjà importante. Les deux méthoxy en 3' et 4' ont donc été conservés pour la suite de l'étude.

Tableau 15. Importance des O-méthyles en position 3' et 4' du cycle B



In vitro

<i>P. falciparum</i> CI_{50} (SD) μM	Cytotoxicité CI_{50} (SD) μM

#	Code composé	R	LogD pH 7.4	MW g/mol	K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
2	MR31528	H	nd	363	1.0 (0.002)	> 27	39.2 (1.1)	69.6 (18.4)	nd	nd
<i>Composés méthoxylés</i>										
3	LPI3283	2'-OMe	nd	507 (sel)	1.5 (0.9)	2.2 (0.2)	28.1 (0.4)	15.2 (4.8)	nd	nd
4	MR31572	3'-OMe	nd	393	0.84 (0.3)	4.7 (0.6)	40.1 (19.7)	5.2 (?)	nd	nd
5	MR31571	4'-OMe	2.83	393	0.92 (0.4)	1.6 (0.02)	41.8 (8.1)	13.3 (12.3)	17.1 (2.0)	34.7 (?)
1	MR27770	3',4'-OMe	2.59	424	1.9 (0.7)	2.1 (0.9)	28.3 (?)	> 70	> 77	5.2 (0.07)
<i>Composés chlorés</i>										
6	LPI3281	2'-Cl	nd	512	1.1 (0.6)	4.7 (0.9)	31.4 (2.5)	11.9 (4.9)	nd	nd
7	LPI3282	4'-Cl	nd	512	0.54 (0.2)	1.5 (0.33)	4.2 (0.7)	11.1 (7.2)	nd	nd
<i>Composés O-benzylés</i>										
8	LPI3280	3'-OBn	3.57	584 (sel)	0.095 (0.04)	0.4 (0.5)	5.5 (3.8)	> 56	10.4 (11.3)	6.0 (2.3)
9	MR27787	4'-OBn	> 4.0	470	0.31 (?)	0.9 (?)	3.4 (?)	24.9 (7.5)	2.7 (1.8)	1.7 (0.8)

ii. Rôle des méthoxyles en positions 5 et 7 du cycle A

La présence d'hydroxyles libres en 5 et 7 a été décrite en 1972 par Griffiths et Smith pour diminuer la stabilité métabolique de par l'ouverture du cycle par le microbiote intestinal (Griffiths and Smith, 1972). De plus, comme nous l'avons déjà explicité, les résultats de Weniger *et al.* montrent que l'activité augmente avec le nombre de méthoxyles pour les biflavonoides présentant une liaison interflavonique de type C-C (Weniger *et al.*, 2006). Nous avons donc évalué l'importance de la

substitution des positions 5 et 7 pour l'activité antipaludique car le nombre important de méthoxyles impacte la solubilité des composés (**Tableau 16**). Il s'avère que l'activité antipaludique est impactée essentiellement pour la souche 7G8 mais que la toxicité est augmentée en supprimant des méthoxyles (#10 vs #2 et #11 #12 vs #1). De plus, le $\log D_{7,4}$ de #10 (1 groupement méthoxyle) et #11 (3 groupements méthoxyles) n'est pas vraiment amélioré par rapport à celui du MR27770 (#1, 4 groupements méthoxyles). Les méthoxyles en 5 et 7 ont donc été conservés pour la suite de l'étude.

Tableau 16. Effet de la suppression des méthoxyles en position 5 et 7 du cycle A dans la série 3',4'-diméthoxy

#	Code composé	R1	R2	R3	Log D pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
							<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM			Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1	
2	MR31528	OMe	OMe	H	nd	363	1.0 (0.002)	> 27	39.2 (1.1)	69.6 (18.4)	nd	nd
10	MR31553	OMe	H	H	2.2	333	2.4 (0.07)	6.1 (2.0)	11.6 (5.1)	11.8 (4.7)	nd	nd
1	MR27770	OMe	OMe	3',4'-OMe	2.59	424	1.9 (0.7)	2.1 (0.9)	28.3 (?)	> 70	> 77	5.2 (0.07)
11	LPI3288	H	OMe	3',4'-OMe	2.47	430	1.7 (0.6)	22.6 (17.6)	29.1 (1.3)	15.8 (1.8)	nd	nd
12	LPI3291	H	H	3',4'-OMe	nd	400	1.9 (0.6)	8.5 (2.2)	16.9 (8.0)	13.7 (0.2)	nd	nd

Le pharmacophore partiel qui résulte de cette étude peut donc être représenté ainsi :

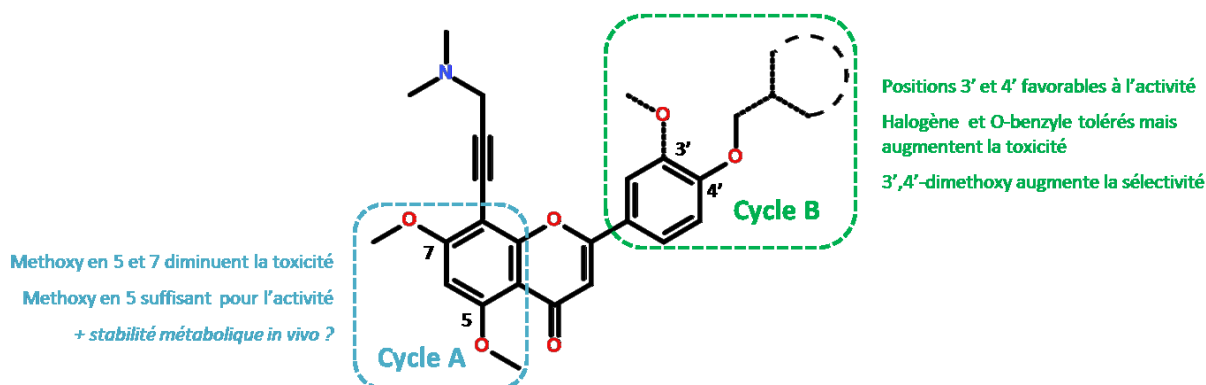


Figure 98. Pharmacophore partiel résultant de l'évaluation de l'importance des groupements méthoxyles en position 5 et 7 du cycle A et des substitutions du cycle B

iii . Importance de l'atome d'azote

L'importance de l'atome d'azote en position 8 a été évaluée via son remplacement par un autre hétéroatome, l'oxygène (éther, hydroxyle).

Tableau 17. Influence de l'atome d'azote en position 8

#	Code composé	R1	R2	Log D pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
						<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM			Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
1	MR27770		3',4'- OMe	2.59	424	1.9 (0.7)	2.1 (0.9)	28.3 (?)	> 70	> 77	5.2 (0.07)
13	LPI3292		3',4'- OMe	nd	410	0.9 (0.3)	7.9 (3.9)	52.3 (8.1)	102.2 (15.5)	nd	nd
14	LPI3356		3',4'- OMe	nd	396	4.0 (2.2)	> 83	89.1 (6.4)	> 252	nd	nd
<i>Homologation</i>											
15	LPI3310		3',4'- OMe	nd	424	> 117	86.4 (62.0)	> 235	> 25	nd	nd
16	LPI3312		3',4'- OMe	nd	410	2.4 (0.9)	32.9 (15.4)	96.6 (31.7)	> 80	nd	nd
17	LPI3297		3',4'- OMe	nd	424	2.8 (0.4)	> 77.8	183.9 (?)	130.2 (74.1)	nd	nd
18	LPI3315		3',4'- OMe	nd	487	0.2 (0.03)	4.6 (7.1)	3.9 (0.4)	4.2 (0.3)	nd	nd
<i>Composé 4'-O-méthylé</i>											
19	LPI3287		4'-OMe	nd	366	1.7 (0.1)	51,2 (60,5)	149.3 (19.5)	90.1	nd	nd
<i>Composé 4'-O-benzylé</i>											
20	MR27799		4'-OBn	nd	443	0.3 (0.07)	> 22	> 168	nd	nd	nd

Pour cette série de composés, de gros écarts ont été constatés entre les résultats obtenus entre la première et la deuxième détermination de CI₅₀ ce qui explique les écarts types importants pour la

souche 7G8. Cet effet est peut-être dû à la faible stabilité du composé dans le DMSO après décongélation, ce qui réduirait l'intérêt de cette série.

Globalement, le remplacement de l'azote par un oxygène donne lieu à des composés moins toxiques (sauf en présence d'un O-Benzyle en 8, #18), mais aussi moins actifs. La présence d'un O-benzyle en position 8 (#18) augmente l'activité mais induit toujours une certaine toxicité. Par contre la combinaison d'un groupement hydroxyle en position 8 et d'un O-benzyle en position 4' (#20) annule la toxicité observée habituellement pour les composés azotés. La toxicité induite par la présence d'un groupement O-benzyle sur le cycle B (cf **Tableau 15**, #8 et #9) doit donc être due à la combinaison d'un azote en 8 et d'un O-benzyle en 4' et non à l'alcyne. On retrouvera ce phénomène dans la série, substitué en 7 où la présence d'un azote en 7 et la substitution par un O-benzyle sur le cycle B conduit à un dérivé toxique, toxicité qui n'est plus présente lorsque le groupement azoté est remplacé par un O-benzyle en 7 et sur le cycle B (cf **Tableau 21**, #55, #56 et #57).

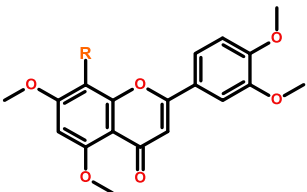
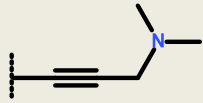
La présence d'un oxygène accepteur de liaison hydrogène (oxygène substitué, #13 et #18) semble stabiliser l'activité par rapport à un donneur/accepteur de liaison hydrogène (OH libre).

L'allongement de la chaîne carbonée (#16, #17) augmente légèrement l'activité, surtout dans le cas où n=2 (#16) mais cette série n'est pas remarquable pour les activités obtenues. Nous ne représenterons donc pas de pharmacophore partiel pour cette série.

iv . Importance de la position de l'amine dans l'espace

Nous avons défini l'importance de l'azote dans l'activité, nous avons ensuite évalué l'importance de l'alcyne et de la longueur de la chaîne carbonée afin de mieux définir la position de l'atome d'azote dans l'espace et par rapport au cycle A (**Tableau 18**). La liaison alcyne étant connue pour sa réactivité car elle est dense en électrons, sa saturation a été réalisée.

Tableau 18. Effet de la saturation de l'alcyne, de la basicité et/ou de l'homologation de la chaîne en position 8

#	Code composé	R	Log D pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
					<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM			Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
					K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
1	MR27770		2.59	424	1.9 (0.7)	2.1 (0.9)	28.3 (?)	> 70	> 77	5.2 (0.07)
1b	MR27770 sel Cl		nd	460	0.66	4.2	98.0	25.6	nd	nd

#	Code composé	R	Log D pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
					<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM			Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
					K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
21	MR31530		nd	428	1.8 (0.4)	14.6 (?)	104.6 (19.9)	> 70	nd	nd
22	LPI3314		nd	437	1.4 (0.003)	52.0 (41.2)	200.2 (?)	> 75	nd	nd
23	LPI3320		nd	522	nd	7.8 (7.2)	nd	8.5 (6.7)	nd	nd
24	LPI3365		1.5	488	0.4 (0.1)	8.4 (0.4)	21.2 (7.1)	12.5 (5.7)	55.8 (11.2)	19.4 (?)
25	LPI3363		4.25	524	0.04 (0.02)	0.6 (0.3)	105.3 (33.4)	> 62	23.9 (9.0)	> 190
26	LPI3364		-1.26	537	0.7 (0.02)	5.2 (0.4)	93.6 (19.6)	> 20	15.1 (2.8)	186.2 (?)

La saturation de l'alcyne diminue l'activité sur la souche 7G8, suggérant la nécessité d'une orientation précise dans l'espace de l'atome d'azote, mais diminue également la toxicité vis-à-vis des cellules L6 (#21). L'ajout d'un carbonyle en alpha de l'azote (#22), atténuant sa basicité, ne modifie pas l'activité vis-à-vis la souche K1 mais diminue l'activité sur la souche 7G8 d'un facteur 25. Là encore la faible solubilité dans le milieu de culture utilisé à Strasbourg peut éventuellement expliquer la différence d'activité mesurée vis-à-vis des deux souches de *Plasmodium* (non soluble dans le DMSO à 20 mg/ml). La substitution de l'amine par un benzyle semble annuler la sélectivité d'activité (#23).

L'allongement de deux atomes de carbone de la chaîne carbonée portant l'amine ne modifie pas réellement l'activité conduisant à des activités antiplasmodiales submicromolaires vis-à-vis de la souche K1 (analogue diméthylaminé #24, amine libre #26). Ces résultats peuvent s'expliquer par un gain de solubilité dû à la forme sel. Par contre, le groupement t-butyloxycarbonyl (BOC, #25)

augmente considérablement l'activité par rapport à ces deux analogues à la fois vis-à-vis de la souche K1 et de la souche 7G8, menant à une valeur de CI_{50} de l'ordre du nanomolaire vis-à-vis de la souche K1 ($CI_{50} = 40$ nM) et faisant de LPI3363, le composé le plus actif de la série. Seuls certains analogues de la série O-benzylée sur le cycle B ont montré des activités de cet ordre et uniquement vis-à-vis de la souche K1 (MR27785, MR27786, MR31544, **Tableau 22**). Nous pouvons supposer que la lipophilie apportée par le groupement protecteur et la faible basicité résultante de l'amine favorisent le passage transmembranaire du composé LPI3363. Le BOC étant un groupement labile à pH acide, il est vraisemblable que le composé soit déprotégé au sein de la vacuole digestive du parasite ($pH \approx 5$), et agirait par conséquent comme une pro-drogue de la forme déprotégée (#26). L'évaluation de l'analogue protégé par un BOC du MR27770 et l'analogue amine primaire est en cours afin de s'assurer de l'importance de l'allongement de la chaîne, car le gain d'activité n'est pas net entre les composés diméthylamine $n = 1$ (MR27770-sel, #1b) et $n = 3$ (LPI3365, #24). Le gain d'activité est accompagné d'une sélectivité maintenue pour le composé #25 ($IS > 100$ vis-à-vis de la plupart des types cellulaires testés). Enfin, la présence d'un BOC sur l'amine (#25) par rapport à une diméthylamine (#24) conduit à une diminution de la toxicité. Le pharmacophore partiel issu de cette série peut donc être représenté ainsi :

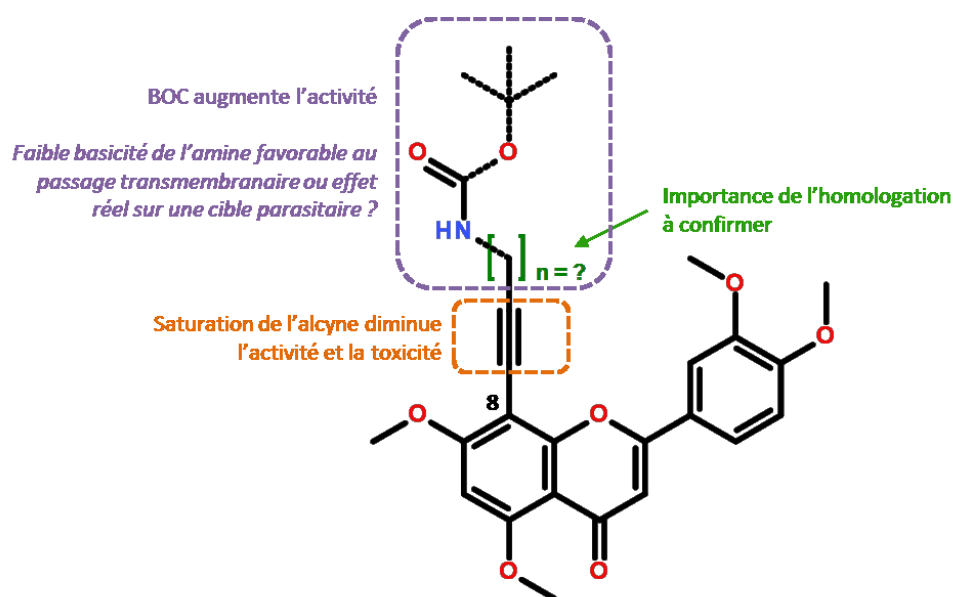


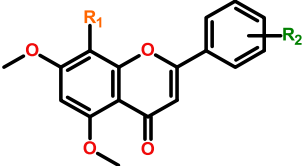
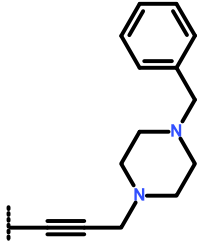
Figure 99. Pharmacophore partiel issu de l'étude de l'importance de la liaison alcyne et de l'homologation de la chaîne carbonée en position 8

v. Effet de la cyclisation de l'amine en position 8

L'exploration autour de l'amine s'est poursuivie par l'étude de l'effet de la cyclisation de l'amine (**Tableau 19**), en série 3',4'-diOMe et 4'-diOMe.

Tableau 19. Effet de la cyclisation de l'amine en position 8

#	Code composé	R1	R2	Log D pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
						<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM			Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
1	MR27770		3',4'-OMe	2.59	424	1.9 (0.7)	2.1 (0.9)	28.3 (?)	> 70	> 77	5.2 (0.07)
27	LPI3316		3',4'-OMe	nd	502	38.5 (4.1)	> 200	> 200	> 200	nd	nd
28	LPI3319		3',4'-OMe	nd	590	0.2 (0.07)	5.1 (5.2)	67.5 (5.8)	119.1 (?)	23.3 (?)	> 56
29	LPI3313		3',4'-OMe	nd	512	0.4 (0.09)	4.4 (4.4)	100.9 (17.8)	> 64	> 64	> 64
5	MR31571		4'-OMe	2.83	393	0.92 (0.4)	1.6 (0.02)	41.8 (8.1)	13.3 (12.3)	17.1 (2.0)	34.7 (?)
30	LPI3279		4'-OMe	1.67	434	0.02 (0.02)	4.3 (1.9)	11.2 (0.6)	15.2 (2.5)	9.6 (3.3)	21.4 (8.6)
31	LPI3284		4'-OMe	nd	560	0.2 (0.1)	3.9 (2.8)	5.0 (0.5)	5.5 (0.7)	nd	nd

#	Code composé	R1	R2	Log D pH 7.4	MW g/mol	In vitro					
						<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM		Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM			
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
32	LPI3285		4'-OMe	nd	548	0.1 (0.07)	2.4 (2.5)	7.6 (1.1)	24.6 (18.3)	17.7 (5.0)	> 60
33	LPI3286		4'-OMe	nd	561	0.1 (0.09)	6.2 (6.6)	10.6 (1.0)	4.6 (1.6)	nd	nd

Le remplacement de la diméthylamine (MR27770, #1) par une morpholine (#27) induit une baisse de solubilité et une absence d'activité antipaludique et cytotoxique. Par contre, la substitution de la diméthylamine par une benzylpiperidine (#28) ou une tétrahydroquinoline (#29) induit un net gain d'activité sur la souche K1 et une absence de toxicité.

Une fois encore, les composés 4'-methoxy (#30 à #33) sont globalement plus toxiques que les composés 3',4'-dimethoxy (#27 à #29), ce qui confirme l'importance du methoxy en 3' dans la sélectivité. Cette différence est marquante lorsque l'on compare les composés benzylpiperidine #28 et #31 pour lesquels l'activité antipaludique est comparable mais la sélectivité est perdue dans le cas du #31. Il n'y a pas de différence notable entre une benzylpiperidine (#31) et une benzylpiperazine (#33) ou quand le benzyle est remplacé par une pyridine (#32). Par contre, on obtient un gain d'activité de 5 à 10 fois quand la pipéridine n'est pas substituée (#30). C'est en effet le composé le plus actif de l'étude sur la souche K1, qui atteint une CI₅₀ de 20 nM. L'analogue 3',4'-dimethoxy est en cours d'évaluation afin de déterminer s'il est possible d'augmenter sa sélectivité. De plus, le logD_{7,4} de ce composé, inférieur à 2, en fait un candidat intéressant.

Le pharmacophore partiel issu de cette série peut donc être représenté ainsi :

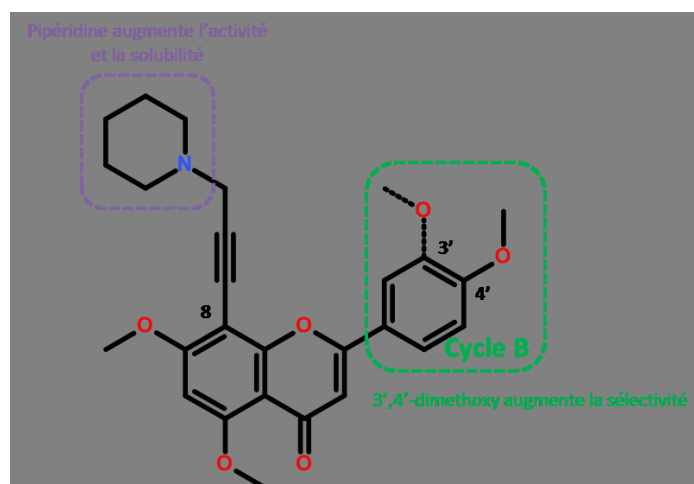


Figure 100. Pharmacophore partiel représentant l'effet de la cyclisation de l'azote

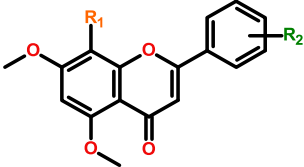
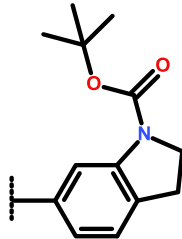
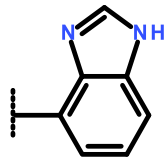
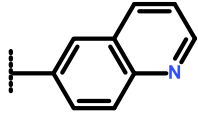
vi. Rigidification de la position de l'azote

Enfin, l'importance de l'alcyne et de la position de l'azote ont été évaluées en remplaçant la triple liaison par divers types de cycles. Les données correspondant à cette étude ont été regroupées dans le **Tableau 20**.

Tableau 20. Rigidification de la position de l'azote

#	Code composé	R1	R2	Log D pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
						<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM			Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
1	MR27770		3',4'-OMe	2.59	424	1.9 (0.7)	2.1 (0.9)	28.3 (?)	> 70	> 77	5.2 (0.07)
2	MR31528		H	nd	363	1.0 (0.002)	> 27	39.2 (1.1)	69.6 (18.4)	nd	nd
34	MR31547		H	nd	359	4.8 (1.9)	19.2 (?)	205.6 (30.3)	> 83	nd	nd
35	LPI3289		3',4'-OMe	nd	419	1.5 (0.8)	24.7 (21.9)	> 238	> 78	nd	nd

#	Code composé	R1	R2	Log D pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
						<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM			Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
36	LPI3290		3',4'-OMe	nd	419	1.8 (0.5)	> 78	137.5 (18.6)	5.2 (?)	nd	nd
37	LPI3300		3',4'-OMe	nd	460	1.9 (0.03)	17.2 (14.0)	61.4 (11.5)	31.5 (1.1)	nd	nd
38	LPI3304		3',4'-OMe	nd	474	1.8 (0.4)	9.1 (4.7)	23.8 (6.4)	11.9 (0.3)	nd	nd
39	LPI3308		3',4'-OMe	nd	466	0.8 (0.3)	2.9 (2.4)	> 214	> 24	nd	nd
40	LPI3299		3',4'-OMe	nd	524	0.04 (0.005)	1.5 (0.2)	6.8 (0.2)	5.2 (0.7)	7.4 (nd)	> 190 (nd)
41	LPI3305		3',4'-OMe	nd	550	nd	5.5 (2.9)	nd	5.9 (0.2)	nd	nd
42	LPI3311		3',4'-OMe	2.63	512	0.5 (0.08)	3.8 (3.5)	18.1 (9.5)	8.5 (5.6)	nd	nd
43	LPI3303		3',4'-OMe	nd	457	1.6 (0.4)	6.5 (3.5)	4.5 (0.8)	16.6 (1.2)	nd	nd
44	LPI3309		3',4'-OMe	nd	516	nd	4.4 (2.2)	nd	> 64	nd	nd
45	LPI3306		3',4'-OMe	nd	604	nd	1.9 (1.0)	nd	59.1 (?)	nd	nd

#	Code composé	R1	R2	Log D pH 7.4	MW g/mol	In vitro					
						<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM		Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM			
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
46	LPI3318		3',4'- OMe	nd	459	0.5 (0.2)	4.7 (3.3)	5.0 (0.2)	9.8 (8.9)	nd	nd
47	LPI3317		3',4'- OMe	nd	560	0.1 (0.09)	1.3 (1.7)	8.4 (1.0)	6.4 (1.5)	2.1 (1.5)	64.1 (14.2)
48	LPI3321		3',4'- OMe	nd	458	1.7 (0.1)	5.8 (0.3)	> 218	> 218	nd	nd
49	LPI3322		3',4'- OMe	3.93	469	0.3 (0.006)	0.6 (0.8)	> 213	> 213	> 213	> 213

Le remplacement de l'alcyne par un noyau pyridine dont l'azote est en position 4 (#34, #35) n'améliore pas l'activité mais donne lieu à des composés non toxiques. Il en est de même quand l'azote de la pyridine est en position 3 (#36), mais le composé est moins actif et plus toxique, notamment vis-à-vis des hépatocytes de souris (Hepa-1.6). L'azote ne semble donc pas être en position optimale dans le cas du noyau pyridine. La tétrahydropyridine induit le même effet antipaludique que le noyau 4-pyridine mais est légèrement plus toxique (#37, #38). A nouveau, quand la basicité de l'azote diminue (#39, #40), l'activité augmente. Dans le cas où l'azote est substitué par un carbonyle (#39) la toxicité est réduite alors que la substitution par un BOC (#40) augmente la toxicité dans ce cas, voire annule la sélectivité si l'on considère la souche 7G8 de *Plasmodium*. La faible solubilité de ce composé dans le milieu de culture peut expliquer en partie la différence observée entre les 2 souches. La phényltétrahydropyridine (#41) n'est plus sélective du tout, un groupement gras semble donc diminuer la sélectivité dans cette position car la cétone #39 n'est pas toxique mais la présence d'un BOC (#40) ou d'un phényle (#41) induit une toxicité similaire.

Le cycle N,N-diméthylaminométhylphényle (#42) ne permet pas vraiment d'optimiser l'activité et induit une faible sélectivité.

La présence d'un cycle indole (#43, #44, #45) ou indoline (#46, #47) est toxique de manière générale, induisant peu voire pas de sélectivité. Le cycle indole portant un azote substitué par un PEG (*polyéthylène glycol*) augmente légèrement l'activité et accroît la sélectivité (#44, #45) par rapport à l'indole nu #43. La PEGylation est connue pour rendre les composés plus solubles et moins toxiques, ce que l'on observe ici (amélioration de l'activité, diminution de la toxicité). Le noyau indoline (#46) permet d'augmenter légèrement l'activité vis-à-vis de la souche K1 mais conserve une toxicité élevée. La substitution de l'azote par un BOC (#47) permet là encore d'augmenter l'activité antipaludique, sans augmenter la toxicité par rapport au composé déprotégé cette fois-ci.

Le noyau benzimidazole (#48) induit une activité modérée sur *Plasmodium* mais n'est pas toxique vis-à-vis des cellules de mammifères. Il en est de même pour le noyau quinoléine (#49), qui permet d'améliorer la CI_{50} sur *Plasmodium* sans présenter de cytotoxicité. Ce noyau, faisant partie intégrante de la structure de la quinine, de la chloroquine et de leurs dérivés, a sans aucun doute des propriétés antipaludiques intrinsèques. Malheureusement, le composé #49 présente des propriétés pharmacologiques non optimales étant donné que l'on n'atteint jamais 100% d'activité, même aux concentrations utilisées les plus élevées (**Figure 101**).

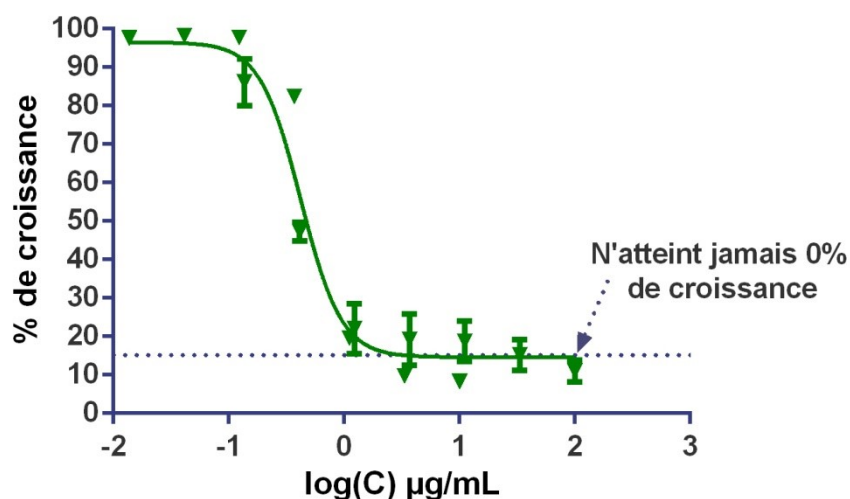


Figure 101. Effet de la concentration de LPI3322 (#49) sur la croissance parasitaire après 72 heures d'incubation (test ELISA pLDH). Le composé ne permet pas d'éliminer tous les parasites, même à la concentration la plus élevée de 100 µg/ml

Le pharmacophore partiel issu de cette série peut donc être représenté ainsi :

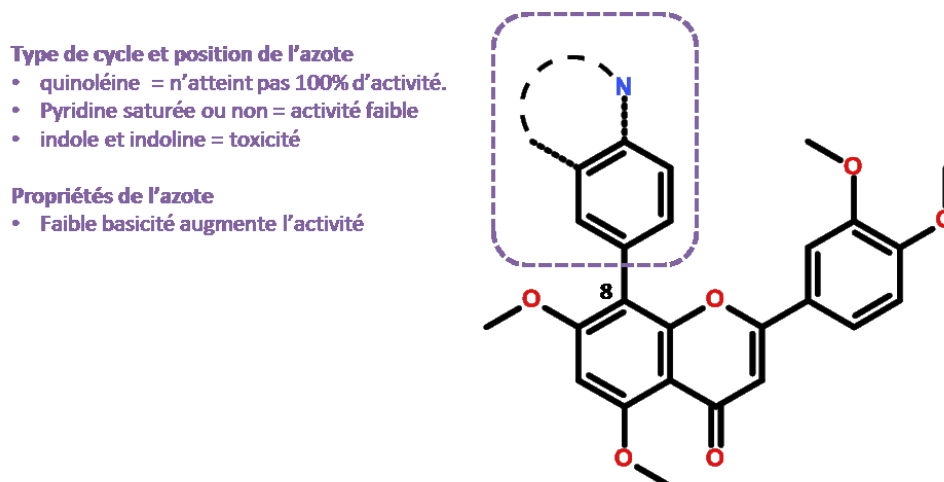


Figure 102. Pharmacophore partiel représentant l'effet de la substitution de l'alcyne par un cycle.

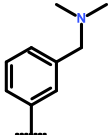
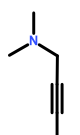
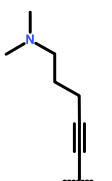
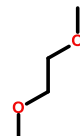
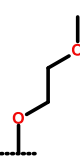
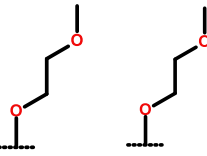
2. Série substituée en position 7

Cette série a été réalisée sur la base de résultats obtenus à partir de flavones synthétiques présentes dans la chimiothèque du CERMN à Caen. Un des dérivés (CLY8, #52), qui s'est avéré particulièrement actif *in vitro* vis-à-vis de *Plasmodium*, était en fait très toxique une fois testé chez l'animal (mort de 4 des 5 souris après une dose de 100 mg/kg). La présence d'un bis-cation (deux chaînes carbonées présentant une fonction amine) serait à l'origine de cette toxicité. Les analogues de certains composés substitués en 8 ont été réalisés afin de s'assurer de l'importance de la position 8.

Tableau 21. Dérivés de flavone substitués en position 7 issus de la chimiothèque du CERMN (Caen)

#	Code composé	R1	R2	R3	R4	MW g/mol	<i>In vitro</i>				
							<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM		Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
							K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF
50	LPI3354	OMe		H	OMe	406	4.2 (0.9)	5.6 (0.4)	13.5 (2.3)	20.0 (3.1)	nd
51	LMR500 (chimiothèque)			OMe	OMe	476	nd	1.3 (0.77)	nd	> 63	nd
52	CLY8 (chimiothèque)	OH			OMe	443	0.003 (0.001)	0.6 (0.2)	23.8 (11.5)	11.7 (3.8)	6.5 (3.9)

#	Code composé	R1	R2	R3	R4	MW g/mol	<i>In vitro</i>				
							<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM		Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	
53	MR31574	OMe	OMe		H	369	2.5 (0.4)	6.9 (7.4)	29.0 (0.2)	16.3 (0.4)	nd
54	MR31575	OMe	OMe		H	383	1.9 (0.3)	4.0 (0.5)	32.7 (3.1)	12.5 (9.4)	nd
55	CLY14 (chimiothèque)	OH			OMe	462	0.7 (0.3)	1.2 (0.8)	10.1 (1.1)	8.3	4.8 (0.02)
56	CLY9 (chimiothèque)	OH			OMe	481	4.5 (2.4)	8.7 (4.1)	> 208	nd	nd
57	LMR509 (chimiothèque)	OMe			OMe	495	2.1 (0.9)	1.1	130.6	> 60	nd
58	LMR267 (chimiothèque)				OMe	586	2.6 (0.9)	17.5 (0.3)	136.6 (29.5)	> 51	nd
59	LMR275 (chimiothèque)	OH			OMe	463	1.6 (0.6)	23.0 (28.8)	24.5 (11.2)	> 65	nd
60	LPI3355	OMe		H	OMe	414	1.5 (0.3)	2.2 (0.9)	8.2 (0.7)	3.9 (0.05)	nd
61	LPI3357	OMe		H	OMe	400	1.7 (0.06)	5.1 (4.4)	14.8 (4.7)	18.8 (12.8)	nd
62	LPI3307	OMe		H	OMe	464	0.8 (0.3)	4.1 (4.1)	11.6 (0.3)	15.7 (7.0)	nd

#	Code composé	Structure				MW g/mol	<i>In vitro</i>				
		R1	R2	R3	R4		<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM		Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	
63	LPI3366	OMe		H	OMe	452	0.2 (0.01)	1.7 (2.5)	1.4 (0.07)	3.4 (3.4)	nd
64	LPI3358	OMe		H	OMe	477	2.1 (0.09)	5.9 (2.8)	18.7 (3.4)	13.5 (3.0)	nd
65	LPI3367	OMe		H	OMe	391	1.4 (0.4)	14.6 (2.9)	38.5 (0.9)	32.3 (15.9)	nd
66	LPI3301	OH		H	OMe	342	pending	> 292	8.2 (4.5)	> 292	nd
67	LPI3353	OMe		H	OMe	356	1.9 (0.6)	100.0 (31.9)	124.9 (71.7)	> 280	nd
68	LPI3302			H	OMe	400	1.8 (0.5)	32.8 (20.1)	37.9 (1.9)	> 250	nd

Les composés de la chimiothèque du CERMN ont permis d'identifier une touche intéressante, le composé CLY8 (#52), dont la toxicité n'a pas été mise en évidence *in vitro*. Cependant, la présence d'un bis-cation [7,3'-(2-(diméthylamino)éthoxy)] entraîne un effet toxique *in vivo* et semble induire un effet non spécifique étant donné que les dérivés présentant un monocation (#50, #53, #54) sont bien moins actifs (perte de 3 logs d'activité) sans que la cytotoxicité ne soit modifiée. Les dérivés qui présentent un groupement O-benzyle (#55, #56, #57, #58) sont moins actifs mais ne présentent plus de cytotoxicité quand la chaîne (2-(diméthylamino)-éthoxy) n'est plus présente (#55 vs #56). La présence d'un méthoxy en position 5 semble améliorer l'activité par rapport au OH libre (#56 vs #57). Globalement, cette série n'est pas très intéressante.

Des analogues des composés synthétisés en position 8 ont également été réalisés. Globalement les composés sont moins actifs et/ou plus toxiques quand ils sont substitués en 7 que lorsqu'ils sont substitués en 8. Les composés #60, #61 et #62 sont les analogues des composés #37, #38 et #40 (**Tableau 20**) et sont représentatifs des situations évoquées : le premier est environ 10 fois plus toxique que le composé substitué en 8, le second n'entraîne pas de différence, et le dernier est moins actif. Le composé #63 est l'analogue du composé #42 (**Tableau 20**). Bien que 2 fois plus actif en position 7, il est 2 à 20 fois plus toxique. Les composés #64 et #66 sont les analogues des composés #5 (**Tableau 15**) et #24 (**Tableau 18**). Dans les deux cas, les composés substitués en 7 sont 2 à 3 fois moins actifs, l'atome d'azote étant sûrement moins bien orienté au niveau du site actif de la cible.

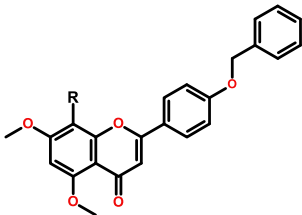
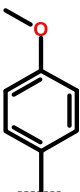
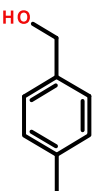
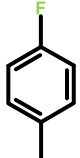
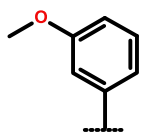
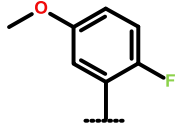
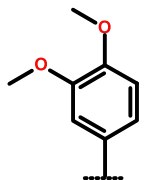
Les composés PEGylés en positions 7 et/ou 5 (#66, #67, #68) sont globalement peu actifs et étonnamment peu solubles en solution aqueuse (les PEGs étant sensés augmenter la solubilité).

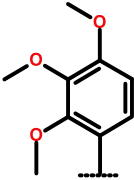
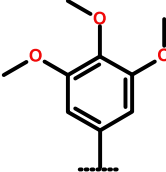
Cette série de dérivés **confirme l'importance de la position 8** pour augmenter l'activité et/ou réduire la cytotoxicité.

3 . Série 4'-O-benzyle

Cette série a été développée à l'origine parallèlement à que la série 3',4'-diméthoxy. Les structures des différents composés de cette série sont représentées dans le **Tableau 22**. Certains composés de cette série se sont avérés particulièrement actifs *in vitro* ($CI_{50} = 0.2$ à $0.4 \mu M$) avec une activité équivalente, voire améliorée par rapport à la lanaroflavone (MR27786, #75), confirmant l'intérêt du châssis retenu pour cette étude. Cependant, comme la lanaroflavone, les composés les plus actifs *in vitro* retenus (MR27785 #70, MR27786 #75) se sont malheureusement avérés inactifs chez la souris à 4×50 mg/kg i.p. ou 4×100 mg/kg p.o. (modèle de Peter, *P. berghei* ANKA, collaboration Swiss TPHI, Bâle). Cette inactivité est vraisemblablement due à l'hydrophobicité élevée de ces composés ($LogD_{7.4} \approx 4.7$) menant à une faible solubilité de ces composés en milieu aqueux ($LogD > 4$) et une forte propension à se concentrer dans les parties grasses de l'animal et ainsi à être peu biodisponibles. Cette série sera donc présentée succinctement ci-dessous et son étude n'a pas été poursuivie.

Tableau 22. Série 4'-O-benzyle


#	Code composé	R	LogD pH 7.4	MW g/mol	In vitro					
					<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM			Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM		
					K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
69	MR27784		nd	465	0.7 (?)	> 10	15.4 (?)	nd	nd	nd
70	MR27785		4.78	495	0.3 (?)	0.2 (?)	66.3 (?)	54.9	86.2	nd
71	MR27795		nd	495	1.2 (?)	> 20	> 202	60.7	nd	nd
72	MR31548		nd	483	0.8 (0.007)	14.8 (14.3)	81.7	53.5 (28.0)	nd	nd
73	MR31544		nd	495	0.3 (0.07)	4.2 (1.9)	7.1 (0.6)	> 60	nd	nd
74	MR31550		nd	513	0.6 (0.03)	3.9 (3.3)	10.7 (0.4)	32.4 (22.9)	nd	nd
75	MR27786		4.72	525	0.2 (?)	0.4 (?)	161.4 (?)	> 57	> 190	> 190

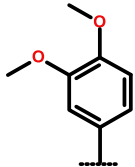
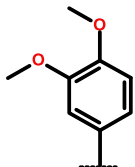
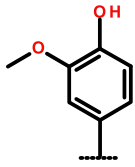
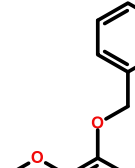
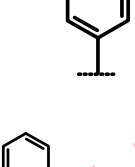
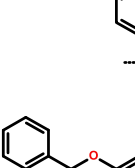
#	Code composé	R	LogD pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
					<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ (SD) μM		Cytotoxicité CI ₅₀ (SD) μM			
					K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
76	MR27797		nd	555	8.0 (?)	> 18	> 176	> 54	nd	nd
77	MR27798		nd	555	nd	> 18	nd	> 54	nd	nd

La substitution du benzène en position 8 par un ou des methoxy en para (#70) ou méta et para (#75) induit une activité plus élevée et une toxicité plus faible que le benzène nu (#69). La seule substitution par un methoxy en méta (#73) diminue l'activité sur la souche 7G8 et augmente la toxicité d'un facteur 10 sur les cellules L6. L'ajout d'un fluor en ortho (#74) n'a pas d'impact. La présence d'un fluor en para (#72) diminue l'activité par rapport à la substitution par un methoxy (#70) sans modifier la toxicité et n'est donc pas bénéfique.

L'inactivité de ces composés *in vivo* étant due, selon notre hypothèse, à une faible disponibilité liée à un LogD_{7.4} élevé, nous avons décidé de synthétiser des analogues présentant un cycle B nu ou 3',4'-diméthoxylé afin de réduire leur lipophilie (**Tableau 23**).

Tableau 23. Activités des composés 8-benzo dont le cycle B est non substitué ou substitué par des méthoxyles en position 3' et 4'

#	Code composé	R1	R2	LogD pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
						<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ +/- SD μM		Cytotoxicité CI ₅₀ +/- SD μM			
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
78	MR31546		H	nd	376	12.7 (2.2)	> 26	64.2 (41.9)	> 26	nd	nd

#	Code composé	R1	R2	LogD pH 7.4	MW g/mol	<i>In vitro</i>					
						<i>P. falciparum</i> CI ₅₀ +/- SD μM			Cytotoxicité CI ₅₀ +/- SD μM		
						K1	7G8	L6	Hepa-1.6	pNHDF	ThP1
79	MR31529		H	nd	418.4	2.1 (0.02)	> 23	10.2 (0.4)	> 23	nd	nd
80	LPI3293		3',4'-OMe	3.36	478	0.9 (0.3)	> 69	128.1 (12.3)	209.2 (nd)	nd	nd
81	LPI3294		3',4'-OMe	nd	464	1.5 (0.09)	38.1 (5.3)	7.0 (4.5)	2.6 (0.3)	nd	nd
82	LPI3298		3',4'-OMe	nd	555	0.4 (0.08)	> 180	139.7 (44.5)	> 60	nd	nd
83	LPI3295		3',4'-OMe	nd	555	40.2 (19.4)	> 180	99.4 (23.8)	> 180	nd	nd
84	LPI3296		3',4'-OMe	nd	525	0.4 (0.08)	3.4 (0.3)	4.3 (1.3)	3.8 (2.4)	nd	nd

La substitution en 3',4'-diméthoxy permet effectivement de réduire le LogD_{7.4} par rapport au 4'-O-benzyle (3.36 pour #80 vs 4.72 pour #75) mais induit également une forte perte d'activité voire une inactivité vis-à-vis de la souche 7G8.

Le remplacement du méthoxy en para du benzène diméthoxylé (#81) par un hydroxy (#78) ne modifie pas vraiment l'activité mais augmente la toxicité d'un facteur 20 à 80 en fonction du type cellulaire

considéré. La substitution par un groupement O-benzyle en méta ou para du cycle benzoïque (#82, #83) diminue l'activité antipaludique, cependant il est difficile de différencier si cet effet est dû à la substitution en elle-même ou à la faible solubilité engendrée par la présence d'un méthoxy. En l'absence de groupement méthoxy (#84), l'activité est améliorée mais il n'y a plus de sélectivité par rapport aux cellules de mammifères.

De façon inattendue, l'évaluation de l'activité antiplasmodiale d'intermédiaires de synthèse portant un benzyle protecteur de l'hydroxyle en 4' sur le cycle B, nous a permis de mettre en évidence un effet positif sur cette activité. En effet, d'une manière générale, la présence d'un groupement O-benzyle en 4' améliore l'activité par rapport à l'absence de substitution du cycle B ou la substitution 3',4'-diméthoxy, suggérant l'importance de la présence d'un groupement encombrant et/ou lipophile dans cette position et confirmant les résultats antérieurement obtenus (Weniger *et al.*, 2006). Les intermédiaires O-benzylés se sont avérés particulièrement actifs (de l'ordre de la centaine de nanomolaire) et non toxiques (indices de sélectivités minima de 183 et 142 respectivement) mais sont malheureusement inactifs *in vivo*.

En conclusion, un pharmacophore partiel peut être représenté à partir de cette série chimique, qui, bien qu'inactive chez l'animal — vraisemblablement à cause d'une lipophilicité trop élevée — présente des activités antipaludiques marquées *in vitro* :

Position

- Para = favorable à l'activité
- Méta = diminue la toxicité

Nature du substituant

- Fluor diminue l'activité
- Hydroxyle augmente la toxicité

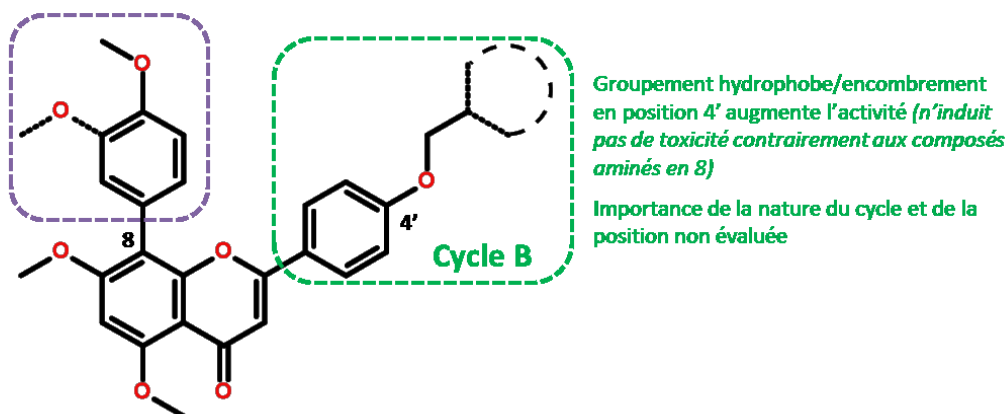


Figure 103. Pharmacophore de la série 4'-O-benzyle

En conclusion, d'après les données de l'étude de relation structure-activité, le pharmacophore peut être représenté ainsi :

Question : importance de la nature et de la position du substituant en position 8

Nature du substituant :

- Amine peu basique augmente l'activité
- Oxygène induit une perte d'activité
- Pipéridine augmente l'activité et la solubilité

Position de l'atome d'azote :

- Importance de l'homologation à confirmer

Conclusion : pipéridine meilleur compromis obtenu

Question : importance de l'alcyne

- Augmente la sélectivité par rapport à cycle insaturé
- Augmente l'activité par rapport à chaîne alkylée

Conclusion : alcyne nécessaire à l'activité

Question : importance de la substitution en position 8

Conclusion : améliore l'activité et/ou la sélectivité par rapport à la position 7

Question : importance des méthoxy en 5 et 7

- Méthoxy en 5 et 7 diminuent la toxicité
- Méthoxy en 5 augmente l'activité antipaludique
- + stabilité métabolique *in vivo* (Griffiths and Smith, 1972)?

Conclusion : méthoxy en 5 et 7 nécessaires à la sélectivité, méthoxy en 5 nécessaire à l'activité

Question : importance des méthoxy en 3' et 4'

- Groupement hydrophobe/ encombrement augmente l'activité et la toxicité
- 3',4'-diméthoxy augmente la sélectivité
- Effet d'un méthoxy en ortho sur la toxicité due au O-benzyle ?

Conclusion : méthoxy en 3' et 4' nécessaires à la sélectivité

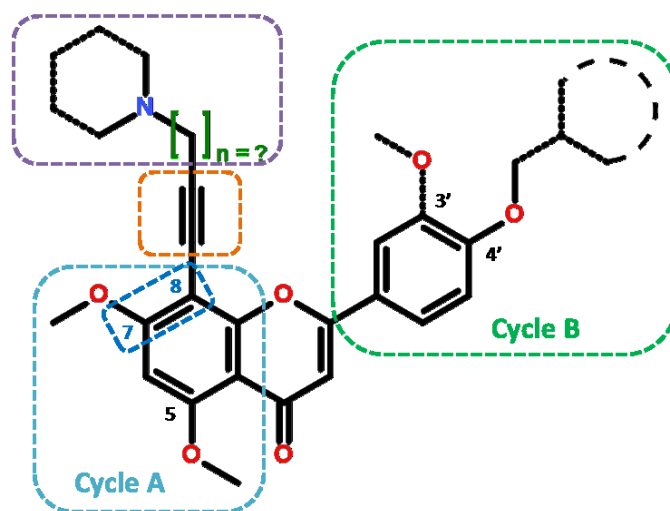


Figure 104. Pharmacophore issu de l'étude de relation structure-activité des dérivés de la Lanaroflavone

E . Profil pharmacologique des dérivés de MR27770

Les propriétés des analogues de MR27770 les plus actifs ont été évaluées chronologiquement en fonction de leur profil pharmacologique mais également de leur disponibilité. Il s'agit du dérivé 4'-O-benzylé (MR27787), du dérivé homologué protégé par un BOC (LPI3363) et son homologue déprotégé en comparaison (LPI3364) et plus récemment, du composé LPI3279, présentant une pipéridine en position 8.

1 . Profil d'action de LPI3363 sur le cycle érythrocytaire

Comme pour MR27770, le profil d'action du composé LPI3363 a été déterminé à chaque stade du cycle érythrocytaire.

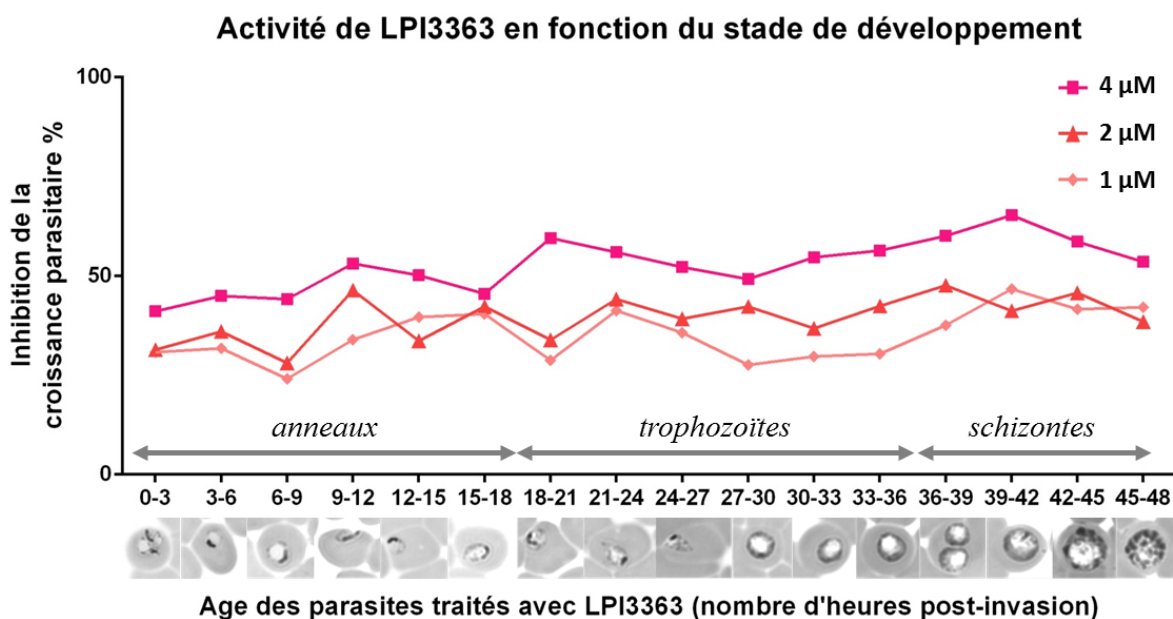


Figure 105. Profil d'action du composé LPI3363 lors du cycle érythrocytaire. Une culture de *P. falciparum* 7G8 a été synchronisée (0-3 heures) et divisée en 16 périodes où les parasites ont été traités durant 3 heures puis lavés afin d'éliminer le composé. Les parasites sont ensuite remis en culture jusqu'à 72 heures après synchronisation, où la parasitémie a été évaluée microscopiquement et comparée à un contrôle traité par une concentration égale de DMSO. Trois concentrations de LPI3363 ont été utilisées : 4 μM (= 5 x CI_{50}), 2 μM et 1 μM . Les images sous le graphe représentent le stade traité au temps t. Les points représentent les données d'une expérience.

Tout comme MR27770, LPI3363 inhibe la croissance du parasite tout au long du cycle. En revanche, alors que l'activité évolue d'une manière concentration dépendante avec MR27770 (**Chapitre 1**), l'activité de LPI3363 ne change pas avec la concentration étudiée. De plus, l'effet n'atteint jamais 100%. Trois heures d'incubation avec LPI3363 (à 5 x la CI_{50} comme pour MR27770) ne suffisent donc pas pour qu'il exerce son effet, ce composé a donc une action plus lente.

2. Rapidité d'action « Killing rate »

Cette conclusion a été confirmée par la réalisation du test de *killing rate*.

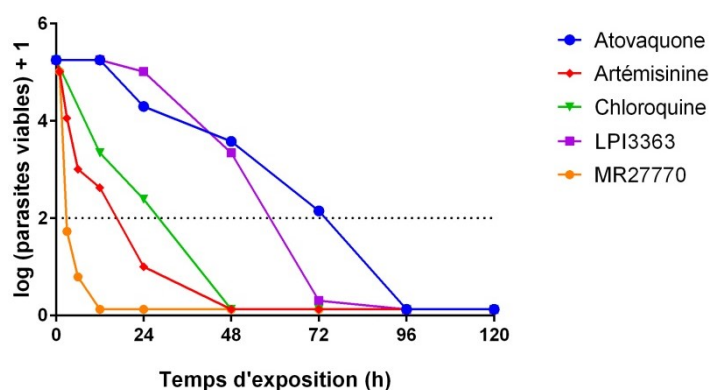


Figure 106. « Killing rate » des analogues de flavone et des substances de référence. Profils de viabilité parasitaire obtenus après incubation de 1 à 120h avec 10 x la CI_{50} d'atovaquone (ATVQ), d'artémisinine, de chloroquine (CQ) de LPI3363 et de MR27770. Souche 7G8, n = 1.

Tableau 24. Paramètres issus de l'expérience *killing rate* pour LPI3363, MR27770 et trois médicaments de référence ayant des rapidités d'action différentes : chloroquine, artémisinine et atovaquone.

Composé	Lag phase (h)	Log(PRR)	PCT _{99,9%} (h)
LPI3363	24	4,7	58,8
MR27770	0	> 5	2,7
Chloroquine	0	2,3	28
Artemisinine	0	> 5	16,6
Atovaquone	24/48	2,1	74,4

Lag phase = temps nécessaire pour atteindre la vitesse d'action maximale ; **Log(PRR)** = *Parasite Reduction Rate*, réduction parasitaire sur un cycle de 48h [$\log(\text{nombre de parasites à 24h}) - \log(\text{nombre de parasites à 72h})$], exprimé en Logs du nombre de parasites ; **PCT_{99,9%}** = temps nécessaire pour réduire le nombre de parasites viables de 3 logs.

En effet, le dérivé LPI3363 présente un profil d'action totalement différent de celui de MR27770 et se rapproche de celui de la pyriméthamine ou de l'atovaquone.

3. Profil des courbes d'inhibition de croissance de *P. falciparum* 7G8

Cette différence de profil pourrait être corrélée à l'allure de la courbe d'inhibition de croissance du parasite, qui est différente de celle de MR27770. MR27770 a plutôt un effet de type « tout ou rien » avec un passage très rapide d'une concentration efficace à une concentration inefficace (*hill slope* = -4,6) alors que l'effet des dérivés homologués LPI3363 et LPI3364 est plus progressif (*hill slope* = -0,5 à -0,8, **Figure 107**).

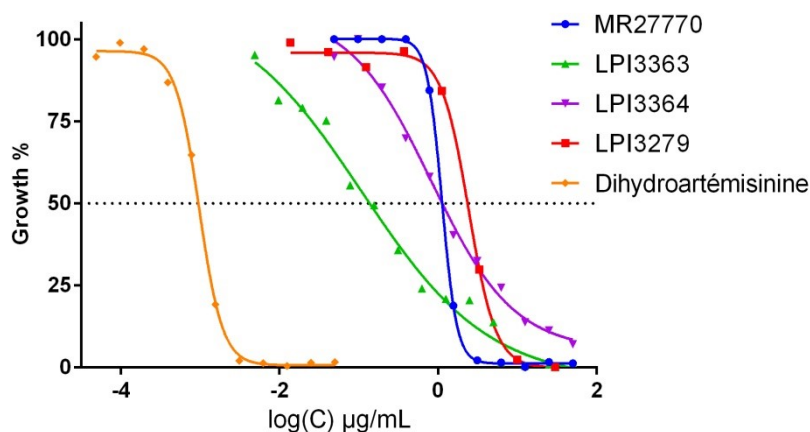


Figure 107. Allure des courbes d'inhibition de MR27770 et de trois de ses dérivés LPI3279, LPI3363 et LPI3364. MR27770 et LPI3279 présentent un effet artémisinine-like (*hill slope* = -4,6, -2,5 et -2,9 respectivement) avec un passage rapide d'une concentration efficace à une concentration inefficace tandis que les dérivés homologués LPI3363 et LPI3364 (*hill slope* = -0,5 et -0,8 respectivement) présentent un profil d'action plus progressif

Cette différence suggère soit une différence de cinétique d'action, soit un mécanisme d'action différent. Sanz *et al.* décrivent que le profil d'action des composés dans le test de *killing rate* dépend de leur mécanisme d'action (Sanz *et al.*, 2012), ce qui pourrait nous faire pencher vers la deuxième

hypothèse. Cependant, le fait que LPI3363 agisse à tous les stades du cycle à concentration constante, comme MR27770, nous amène à remettre en question cette hypothèse.

4. Activité *in vitro* vis-à-vis de souches de laboratoire multirésistantes

Nous avons évalué l'activité de MR27770 et de ses dérivés vis-à-vis de 3 souches multirésistantes de *P. falciparum* à notre disposition : 7G8, K1 et W2-mef.

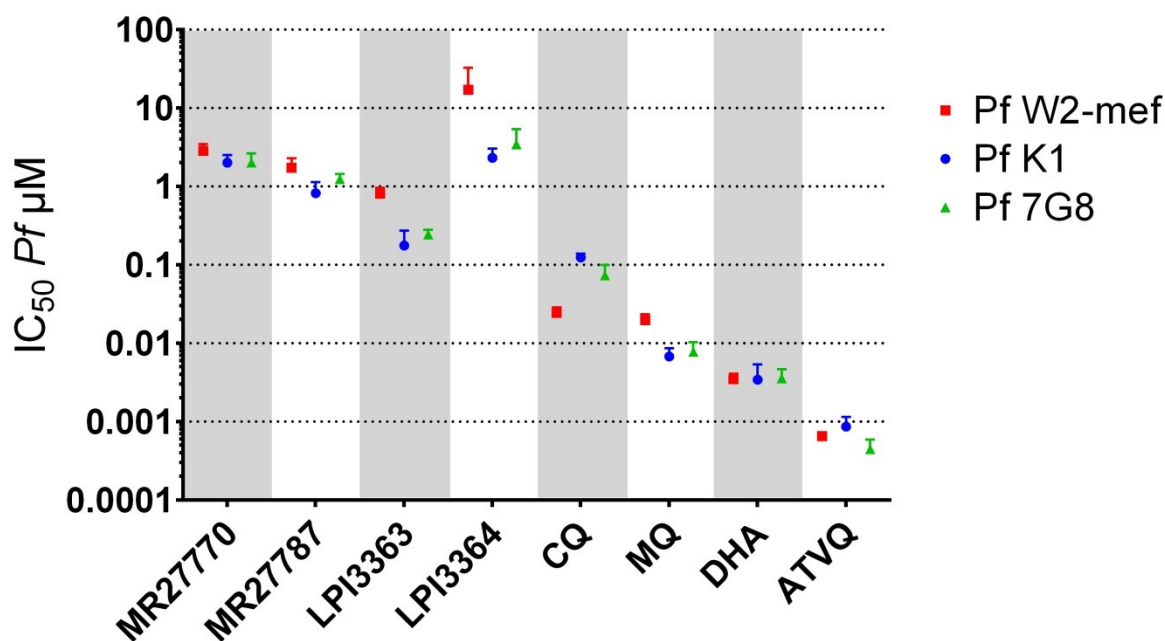


Figure 108. Activité de MR27770, de ses analogues et de différents médicaments de référence vis-à-vis de trois souches de laboratoire multirésistantes. 7G8 : souche résistante à la chloroquine, la pyriméthamine et au cycloguanil (Burkot *et al.*, 1984) ; K1 : souche résistante à la chloroquine, la pyriméthamine, au cycloguanil et à la sulfadoxine (Thaithong and Beale, 1981) ; W2-méf : souche résistante à la chloroquine, la pyriméthamine, au cycloguanil, à la sulfadoxine et à la méfloquine (Oduola *et al.*, 1988). Pf : *P. falciparum* ; CQ = chloroquine, MQ = méfloquine, DHA = dihydroartémisinine, ATVQ = atovaquone

L'artémisinine et l'atovaquone présentent une activité conservée vis-à-vis des 3 souches et la souche W2-mef présente bien une perte de sensibilité à la méfloquine par rapport aux deux autres (20 nM versus 7 nM pour les deux autres souches) même si cette activité est inférieure à la limite de 60 nM largement acceptée pour la résistance à la méfloquine. Étonnamment, les résultats obtenus montrent que la souche W2-mef, dans nos mains, ne présente pas de résistance à la chloroquine. Cela peut-être dû au fait que cette souche est adaptée depuis longtemps en culture et que cette résistance a pu être perdue.

Il est intéressant de noter que MR27770 a une activité conservée sur les 3 types de souches, tout comme MR27787 (son analogue 4'-O-benzylé) alors que les dérivés homologués LPI3363 et LPI3364 perdent leur activité sur la souche W2-mef. La présence de canaux MDR-1 semble donc impliquée dans la perte d'activité de ces deux composés et l'homologation du composé MR27770 ne semble donc pas bénéfique à cet égard.

N'ayant pas de souche sensible à notre disposition, nous n'avons pas pu évaluer l'efficacité des dérivés de flavone en l'absence de résistance. Néanmoins, certains dérivés avaient été évalués par le Swiss TPH (collab. M. Kaiser) à la fois sur la souche NF-54 (sensible aux antipaludiques) et la souche K1 et étaient en moyenne 2,2 +/- 0,8 fois plus actifs sur la souche résistante par rapport à la souche sensible (**Figure 109**).

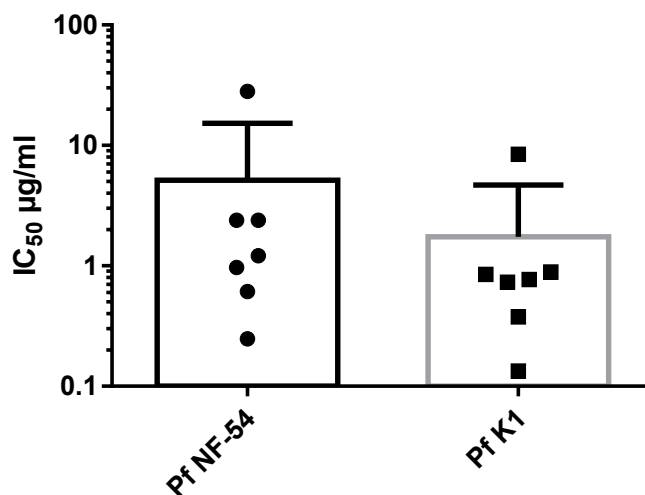


Figure 109. Activité de sept dérivés de la lanaroflavone vis-à-vis de la souche sensible NF-54 et de la souche multi-résistante K1 (test d'incorporation de l'³H-hyoxanthine)

En conclusion MR27770 et son dérivé O-benzylé MR27787 présente la même sensibilité vis-à-vis de deux souches résistantes à la chloroquine et aux antifolates et d'une souche résistante à la chloroquine, aux antifolates et à la méfloquine. Par contre, les dérivés homologués en n = 3 présentent une sensibilité diminuée lorsque la souche est résistante à la méfloquine, confirmant l'intérêt de la position de l'azote. Les dérivés de la lanaroflavone semblent également légèrement plus efficaces sur la souche multirésistante K1 par rapport à la souche sensible NF-54 (dans la limite des composés évalués).

5. Propriétés pharmacocinétiques et métabolisme du dérivé LPI3363

L'inhibition des cytochromes et les paramètres pharmacocinétiques *in vivo* du composé LPI3363 ont été évalués afin de pouvoir les comparer à ceux obtenus pour MR27770 (prestation externalisée WuXi AppTec, Shanghai).

Tableau 25. Inhibition des cytochromes P450 par le composé LPI3363 et la référence MR27770 (CI₅₀ en µM)

Composé	CI ₅₀ (µM)				
	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4-M
LPI3363	> 50	6,93	> 15	5,68	> 50
MR27770	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

Incubation 10 min à 37°C, 8 concentrations, cytochromes humaines (prestation externalisée WuXi AppTec, Shanghai)

LPI3363 inhibe deux cytochromes avec une CI_{50} inférieure à 10 μM (CYP2C9 et CP2D6) et inhibe modérément la CYP2C19. Bien que les CI_{50} obtenues restent supérieures à la limite de 1 μM fixée par MMV, MR27770 présente donc à nouveau un profil plus intéressant que le dérivé LPI3363.

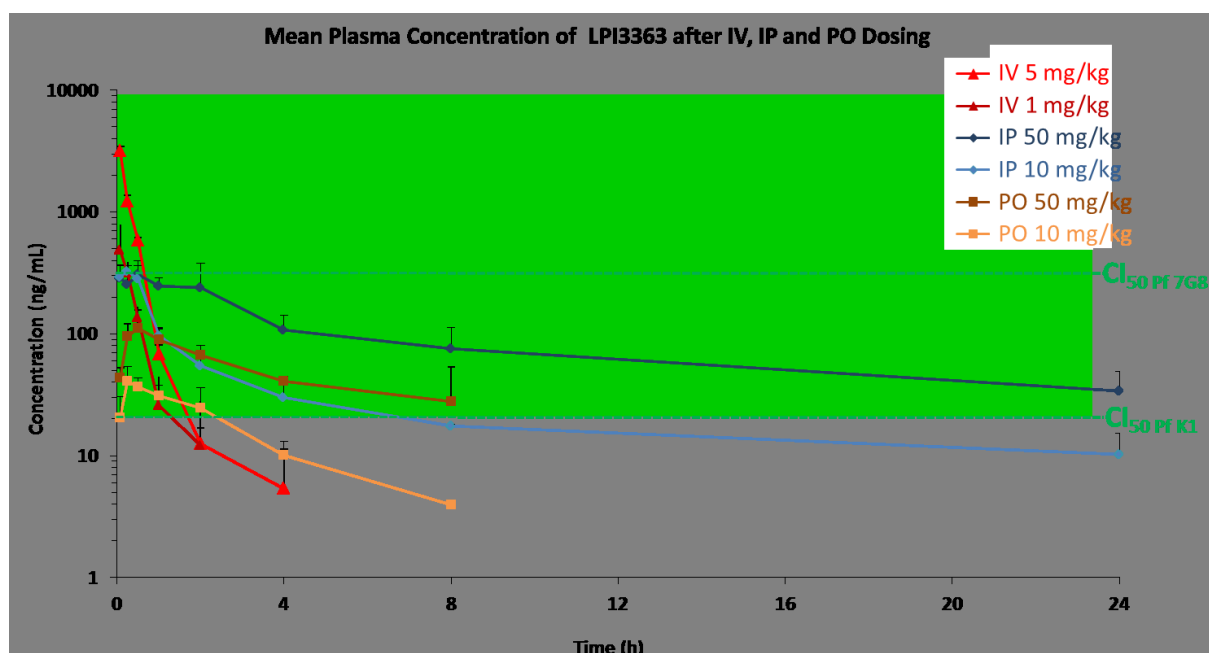


Figure 110. Concentration plasmatique après injection i.v., i.p. ou p.o. du composé LPI3363 chez la souris (3 animaux par groupe). La CI_{50} obtenues vis-à-vis des souches K1 et 7G8 de *P. falciparum* sont représentées.

Concernant sa pharmacocinétique (Tableau 26 et Figure 110), étant donné que le composé comporte un groupement protecteur de type BOC, qui est éliminé à pH acide (et donne le composé déprotégé LPI3364), nous nous attendions à ce que la biodisponibilité par voie orale soit moins bonne que celle du composé MR27770 (< 5 % vs 17 à 30 % pour MR27770). Cependant, bien que la biodisponibilité soit meilleure par voie i.p., la concentration maximale atteinte pour le composé reste faible (environ 350 ng/ml, ce qui représente environ la CI_{50} obtenue vis-à-vis de la souche 7G8 et environ 9 fois la CI_{50} obtenue vis-à-vis de la souche K1 de *P. falciparum*). De plus la clairance élevée du composé (environ 60 ml/min/kg) limite vraisemblablement la C_{max} et est synonyme d'un métabolisme et d'une élimination rapides.

Tableau 26. Paramètres pharmacocinétiques mesurés chez la souris pour le composé LPI3363

	i.v. 5 mg/kg	i.v. 1 mg/kg	i.p. 50 mg/kg	i.p. 10 mg/kg	p.o. 50 mg/kg	p.o. 10 mg/kg
C_0/C_{max} (SD) (ng/ml)	5155 (449)	716 (497)	345 (46.1)	354 (22.5)	113 (44.1)	44.6 (11.5)
T_{max} (SD) (h)	/	/	0.861 (1.01)	0.278 (0.21)	0.417 (0.144)	0.417 (0.144)
F (SD) (%)	/	/	18.8	32.2	3.57	4.85

	i.v. 5 mg/kg	i.v. 1 mg/kg	i.p. 50 mg/kg	i.p. 10 mg/kg	p.o. 50 mg/kg	p.o. 10 mg/kg
AUC_{0-inf} (SD) (ng.h/ml)	1078 (23.9)	246 (49.0)	2591 (1072)	1075 (532)	693 (516)	125 (29.4)
T_{1/2} (SD) (h)	1.04 (0.704)	0.852 (1.05)	10.5 (3.51)	20.3 (19.9)	4.79 (4.03)	2.01 (0.524)
Cl (SD) (ml/min/kg)	63.6 (1.42)	54.3 (11.3)	/	/	/	/
Vd_{ss} (SD) (L/kg)	1.36 (0.575)	2.35 (2.44)	/	/	/	/

La concentration plasmatique du métabolite déprotégé LPI3364 a été suivie au cours du temps (aire du pic) et représentée par rapport à celle du composé LPI3363 (**Figure 111**). L'absorption de ce métabolite est quasi-identique quelle que soit la dose administrée mais il semble faiblement absorbé, l'aire du pic obtenue étant proche de celle obtenue pour le LPI3363 à 1 h, correspondant à environ 90 ng/ml. Cette concentration est faible étant donné que le métabolite (LPI3364) était 9 à 18 fois moins actif que LPI3363 *in vitro* vis-à-vis de *Plasmodium*. De plus, il est quasi-totalement éliminé à 8 h et l'action beaucoup plus lente *in vitro* observée pour le composé LPI3363 par rapport à MR27770 fait qu'il est peu probable que ce composé présente une activité chez l'animal.

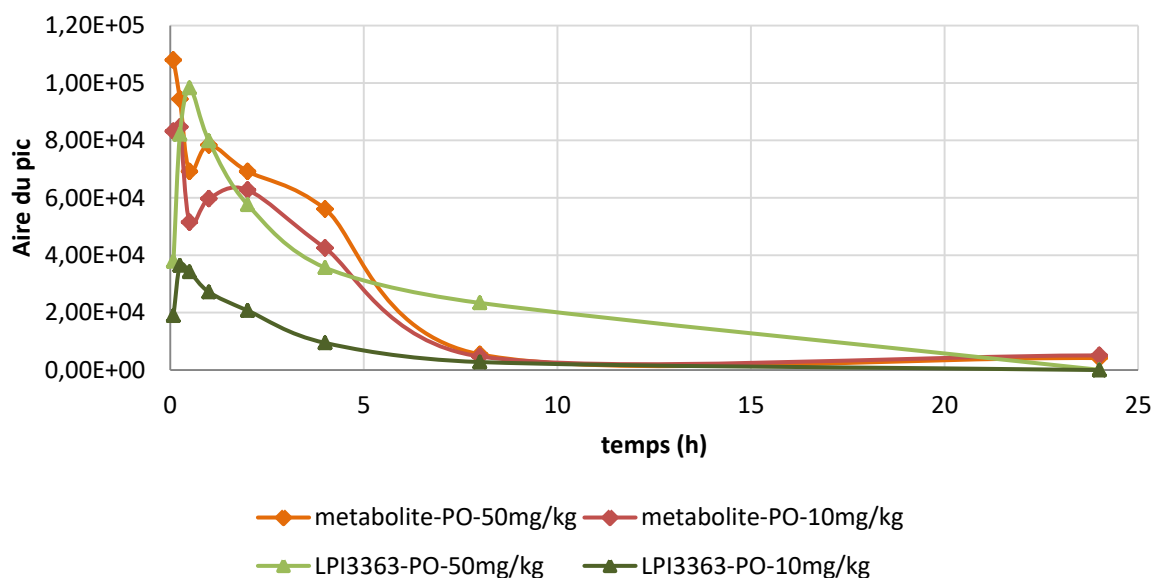


Figure 111. Aires sous la courbe du composé LPI3363 et de son métabolite déprotégé, le composé LPI3364, après administration *per os* chez la souris de 10 et 50 mg/kg de LPI3363.

Le composé MR27770 présente donc une pharmacocinétique intéressante contrairement à son analogue n = 3 protégé par un BOC dont l'absorption est limitée et l'élimination plus rapide.

6 . Efficacité chez l'animal

L'efficacité de certains dérivés MR a été évaluée *in vivo* à Strasbourg (E. Candolfi, IPPTS) selon le modèle des quatre jours de Peter.

Tableau 27. Activité *in vivo* de trois dérivés de la lanaroflavone (4 x 100 mg/kg, sauf MR27787: 2 x 100 mg/kg) et de la chloroquine (4 x 25 mg/kg) obtenue sur des souris Swiss infectées par 2.10^6 globules rouges infectés par *P. berghei* ANKA. Modèle des quatre jours de Peter.

	Pourcentage d'inhibition comparé au contrôle (SD) %		
	J4	J5	J6
MR27770	35,5 (34,2)	47,7 (22,2)	52,5 (17,2)
MR27787	68,8 (25,5)	74,1 (21,4)	70,4 (24,2)
MR27785	0 (50,9)	12,3 (24,5)	0 (6,7)
Chloroquine	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Trois composés ont ainsi été évalués *in vivo*, le composé MR27770 et son dérivé 4'-O-benzylé le composé MR27787 ainsi que le composé MR27785 appartenant lui aussi à la série 4'-O-benzyle mais substitué en position 8 par un benzène methoxylé. Le composé 8-benzo MR27785 s'est avéré inactif *in vivo* contrairement aux dérivés 8-diméthylaminopropylène MR27770 et MR27787 ce qui confirme l'importance de la chaîne amino-alkyle en position 8. Le composé MR27787 bien que plus actif que le composé MR27770 après seulement deux doses, s'est avéré toxique chez l'animal (prostration, léthargie, d'où l'interruption du traitement). Cette toxicité, bien que réversible à l'arrêt du traitement, nous a poussés à poursuivre l'étude de relation structure-activité autour du composé MR27770, non toxique à une dose de 300 mg/kg.

Le composé LPI3363, dont la pharmacocinétique s'est avérée peu adaptée à une activité *in vivo* a néanmoins été évalué dans le même modèle (coll. M. Kaiser, Swiss TPHI, 50 mg/kg/j) et s'est révélé inactif. Le choix d'un nouveau candidat se porte actuellement et pour la poursuite de l'étude sur le composé LPI3279 qui n'avait pas été retenu initialement car il est peu actif vis-à-vis de *Plasmodium* dans les conditions *in vitro* utilisées à Strasbourg. Néanmoins, c'est le composé le plus actif vis-à-vis de la souche K1 ($CI_{50} = 20$ nM, coll. M. Kaiser, Swiss TPHI), il présente une courbe d'inhibition artémisinine-like comme MR27770, une bonne solubilité ($\text{LogD}_{7,4} = 1,67$) et sa sélectivité pourrait être améliorée par l'addition d'un méthoxyle en 3'. Ses propriétés pharmacologiques restent néanmoins à évaluer de façon complète pour confirmer son potentiel en tant que nouveau composé tête-de-série.

F . Conclusion

Nous avons montré au travers de cette étude de RSA approfondie que le châssis de MR27770 était quasiment celui du pharmacophore. L'amélioration de son activité est possible, néanmoins, dans le cas des composés homologués, les propriétés marquantes de MR27770 sont perdues (rapidité d'action, absence de résistances croisées, élimination lente *in vivo*). Il reste maintenant à définir si le dérivé LPI3279 conserve les propriétés de MR27770 et son activité *in vivo*. Le fait que la structure n'est que peu modifiée par rapport à celle du composé tête-de-série (cyclisation de la diméthylamine en position 8) nous laisse penser que la pharmacocinétique devrait être comparable. Reste à évaluer si l'action est rapide et comparable à celle de MR27770 ou non. Enfin, l'étude de RSA devra se poursuivre afin de tenter d'optimiser d'avantage l'activité *in vivo*.

Bibliographie du chapitre 3

- Burkot, T.R., Williams, J.L., and Schneider, I. (1984). Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* clones grown *in vitro* from the same isolate. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 339–341.
- Griffiths, L.A., and Smith, G.E. (1972). Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation *in vivo* and by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. J.* 128, 901–911.
- Helgren, T.R., Sciotti, R.J., Lee, P., Duffy, S., Avery, V.M., Igbinoba, O., Akoto, M., and Hagen, T.J. (2015). The synthesis, antimalarial activity and CoMFA analysis of novel aminoalkylated quercetin analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25, 327–332.
- Oduola, A.M.J., Milhous, W.K., Weatherly, N.F., Bowdre, J.H., and Desjardins, R.E. (1988). *Plasmodium falciparum*: Induction of resistance to mefloquine in cloned strains by continuous drug exposure *in vitro*. *Experimental Parasitology* 67, 354–360.
- Sanz, L.M., Crespo, B., De-Cózar, C., Ding, X.C., Llergo, J.L., Burrows, J.N., García-Bustos, J.F., and Gamo, F.-J. (2012). *P. falciparum* *In Vitro* Killing Rates Allow to Discriminate between Different Antimalarial Mode-of-Action. *PLoS ONE* 7, e30949.
- Sedlacek, H.H. (2001). Mechanisms of action of flavopiridol. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38, 139–170.
- Thaithong, S., and Beale, G.H. (1981). Resistance of ten Thai isolates of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and pyrimethamine by *in vitro* tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 271–273.
- Wein, S., Maynadier, M., Tran Van Ba, C., Cerdan, R., Peyrottes, S., Fraisse, L., and Vial, H. (2010). Reliability of Antimalarial Sensitivity Tests Depends on Drug Mechanisms of Action. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 1651–1660.
- Weniger, B., Vonthron-Sénécheau, C., Kaiser, M., Brun, R., and Anton, R. (2006). Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine* 13, 176–180.
- (1999). *Handbook of animal models of infection: experimental models in antimicrobial chemotherapy* (San Diego: Academic Press).

Discussion et conclusion générale de l'étude

Discussion et conclusion générale de l'étude

Ces travaux de thèse avaient pour but de caractériser les dérivés de la lanaroflavone et de mettre en évidence l'intérêt de la série chimique. En parallèle, la poursuite du versant biologique de l'étude RSA a été réalisée afin d'améliorer l'activité du composé chef-de-file.

Propriétés pharmacologiques du composé MR27770

Le chef-de-file des dérivés de la lanaroflavone, MR27770, présente des propriétés phénotypiques intéressantes : il est actif tout au long du cycle érythrocytaire à la même concentration avec une action rapide. Ce type de profil est recherché pour le développement de nouveaux antipaludiques car il permet de cibler le parasite quel que soit son stade de développement dans le cycle et n'induit donc pas de phase de latence préalable à l'effet attendu. De plus, ces composés agissent de façon aussi efficace sur les stades anneaux jeunes et schizontes que sur les stades trophozoïtes. Dans le test décrit par Sanz *et al.*, 2012, de façon totalement inédite, MR27770 élimine 99 % des parasites en moins de 3 heures à concentration efficace ($10 \times \text{CI}_{50}$). De plus, le gonflement du parasite induit par ce traitement pourrait contribuer à augmenter cette activité *in vivo* car son volume est augmenté, le globule rouge parasité pourrait ainsi possiblement être d'avantage éliminé par la rate. En effet, les anneaux occupant peu de place au sein de l'hématie, ceux-ci sont en général peu affectés par la filtration splénique. Les formes plus âgées sont par contre retenues dans les capillaires profonds des organes en cas d'infection par *P. falciparum*. De plus, au stade anneau la pression osmotique engendrée pour l'hématie est la plus faible du cycle de développement du parasite. Celle-ci augmente au fur-et-à-mesure de l'augmentation de volume du parasite au sein de l'hématie. Cette pression est maintenue quasi constante tout au long du cycle grâce à une régulation fine de l'osmolarité de la cellule hôte par le parasite et par la digestion d'une quantité importante d'hémoglobine (Lew, 2003). Ainsi, l'augmentation du volume du parasite induite par le traitement par MR27770 pourrait fragiliser cet équilibre et mener à la rupture de l'hématie parasitée ou encore au *pitting* du parasite lors de la filtration splénique (Buffet *et al.*, 2011).

En plus d'agir sur les anneaux, nous avons pu montrer lors d'une mobilité de six mois à l'Institut Pasteur du Cambodge (collab. B. Witkowski), que MR27770 conserve son activité vis-à-vis d'isolats multi-résistants à l'artémisinine et/ou à ses partenaires actuellement prévalents au Cambodge. En effet, MR27770 ne semble pas présenter de résistances croisées, ni avec les dérivés de l'artémisinine, ni avec les médicaments partenaires méfloquine, amodiaquine et pipéraquline, suggérant un mécanisme d'action original.

Les propriétés pharmacocinétiques du composé chef-de-file sont prometteuses et inattendues compte tenu de sa structure (noyau riche en électrons) : sa clairance est faible et conduit à une demi-vie longue.

Cette faible clairance observée peut-être due à une faible clairance intrinsèque du composé ou à une forte liaison aux protéines plasmatique. L'évaluation de ces paramètres en collaboration avec MMV nous permettra de mieux comprendre l'origine de cet effet. De plus, le composé MR27770 présente un logD convenable de 2,6, l'amine contribuant probablement à améliorer la solubilité par rapport aux composés de la série 8-benzylée. Améliorer d'avantage sa solubilité pourrait augmenter le volume de distribution du composé et ainsi augmenter d'avantage sa demi-vie plasmatique. Ce composé présente également une biodisponibilité par voie orale intéressante de 30 % (10 mg/kg), l'absorption semblant néanmoins être saturée à la dose la plus élevée de 50 mg/kg. Le composé n'inhibe pas les cytochromes P450 couramment impliquées dans les interactions médicamenteuses permettant d'envisager une utilisation en association avec d'autres médicaments, notamment avec des anti-retroviraux, les patients infectés par le VIH étant plus sujets au paludisme. Cependant, les inhibiteurs de protéase et les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse étant connus pour inhiber le CYP3A4 et la glycoprotéine-P et induire des interactions médicamenteuses avec la chloroquine et l'amodiaquine (Fehintola *et al.*, 2011), il faudra également vérifier si MR27770 est substrat ou non de ces enzymes.

MR27770 possède donc toutes les caractéristiques à exploiter pour mener à l'obtention d'un composé puissant *in vivo*, excepté son niveau d'activité antipaludique *in vitro* qui n'est que de l'ordre du micromolaire. En effet, l'activité mesurée chez la souris impaludée n'est par conséquent que partielle mais pourrait être optimisée en améliorant l'activité *anti-Plasmodium in vitro* d'un facteur 10 à 100, tout en conservant le même phénotype et les mêmes propriétés pharmacocinétiques.

Exploration du mécanisme d'action

La rapidité d'action qui a été mise en évidence pour le composé MR27770 et le fait que le composé soit actif à tous les stades de développement du parasite nous laissent penser que ce composé induit un effet rapide, de type stress osmotique ou métabolique qui mène à la mort du parasite.

Le fait que MR27770 et certains de ses dérivés aient démontré une activité vis-à-vis des hématozoaires *Plasmodium*, *Babesia* et *T. brucei* et un phénotype conservé dans les genres *Plasmodium* et *Babesia*, alors qu'ils ne présentent pas de sélectivité vis-à-vis des protozoaires parasitant les cellules nucléées (*Toxoplasma*, *Leishmania*, stades hépatiques de *Plasmodium*) nous indique que son effet ne se produit que durant la phase érythrocytaire. *T. brucei* étant un parasite extracellulaire, cela nous indique également que le globule rouge n'est vraisemblablement pas impliqué. De même, *Babesia* désintégrant rapidement la membrane de la vacuole parasitophore après son entrée dans la cellule hôte, celle-ci n'est probablement pas impliquée non plus dans l'effet de MR27770 (Homer *et al.*, 2000).

Plusieurs sources décrivent un gonflement du parasite après traitement et précisent les cibles moléculaires impliquées :

- Les composés ciblant **PfATP4**, un canal sodique exprimé à tous les stades du cycle érythrocytaire, localisé sur la membrane plasmique du parasite et nécessaire à l'homéostasie cellulaire. Ces composés agissent de façon rapide *in vivo* dans un modèle de souris humanisées, le composé chef-de-file (+)-SJ733 n'étant pas actif sur *P. berghei*. Cet effet rapide *in vivo* serait dû notamment à des perturbations de la structure du globule rouge infecté qui présente une rigidité membranaire accrue et l'externalisation de phosphatidylsérine au niveau de sa membrane plasmique, indiquant une éryptose (mort programmée des globules rouges) ou une sénescence et menant à l'augmentation de sa filtration splénique. De plus, les composés ciblant *PfATP4* n'ont pas d'activité vis-à-vis des stades hépatiques de *Plasmodium*. Cependant, le profil obtenu avec le test de *killing rate in vitro* s'éloigne de celui de MR27770 car il est similaire à celui de la pyriméthamine (Jiménez-Díaz *et al.*, 2014). L'évaluation de l'activité de MR27770 vis-à-vis de ce canal sodique pourrait être réalisée par la technique de patch-clamp, mesurant l'activité électrophysiologique d'un canal membranaire en présence et en absence d'inhibiteur.
- L'inhibition du **cotransporteur membranaire lactate-H⁺ (PfFNT)** qui permet l'efflux de lactate. L'inhibition du transporteur induit une acidification du cytosol et un gonflement du parasite et du globule rouge infecté (Golldack *et al.*, 2017; Hapuarachchi *et al.*, 2017). Ce transporteur est présent au niveau de la membrane plasmique du parasite. Cependant l'exposition de *P. falciparum* 3D7 à une pression continue de trois fois la CI₅₀ a donné lieu à la sélection de mutants résistants en moins de trois semaines (SNP G107S sur le gène *pfnt*) ce qui n'est pas le cas pour MR27770. De plus, chez *Babesia bovis*, *BbFNT* présente une sérine dans une position correspondant à la glycine 107 de *PfFNT* (*BbFNT* S93) ce qui induit une résistance naturelle de *B. bovis* aux composés décrits par Golldack *et al.* Cette activité est restaurée lorsque la sérine de *BbFNT* est remplacée par une glycine (Golldack *et al.*, 2017). Or MR27770 présente une activité plus importante sur *B. divergens* que sur *P. falciparum*, il semble donc peu probable que *PfFNT* soit la cible de MR27770 (sous réserve que la séquence d'acide aminés soit conservée entre *B. bovis* et *B. divergens*).
- L'inhibition de la pompe à protons **H⁺-ATPase de type V**, présente sur la membrane plasmique et la membrane de la vacuole digestive. Cette pompe permet le maintien d'un pH cytosolique neutre (7,3) et d'un pH acide au sein de la vacuole digestive (4,5 à 5,5) ainsi que d'un potentiel membranaire négatif au niveau de la membrane plasmique parasitaire. Bien qu'il ne soit pas clairement indiqué que l'inhibition de cette pompe induit un gonflement du parasite, les inhibiteurs induisent un effet rapide (moins de 4 heures suffisent pour obtenir la même CI₅₀ qu'après 48 heures d'incubation) et induisent une acidification du cytoplasme (van Schalkwyk *et al.*, 2010), ces effets ayant été décrit précédemment avec *PfFNT* pour provoquer un gonflement du parasite (Golldack *et al.*, 2017; Hapuarachchi *et al.*, 2017). A nouveau, la

mesure de l'activité électrophysiologique de ce transporteur par la technique de patch-clamp pourrait nous indiquer si MR27770 exerce son effet par ce biais.

- Les inhibiteurs de la voie de **biosynthèse des stérols** (inhibiteurs de la voie des gibbérelines, hormones végétales) induisent également un phénotype de gonflement et d'éclatement du parasite mais n'ont aucun effet au stade anneau hormis le fait que les parasites sont plus fréquemment collés à la membrane de l'érythrocyte (forme marginale ou appliquée). Cet effet semble donc différent de celui de MR27770 qui est actif tout au long du cycle érythrocytaire. Les auteurs concluent que l'absence de synthèse des stérols **déstabilise les membranes** du parasite et induit un afflux d'eau qui va provoquer son gonflement puis son éclatement. Nous avons pu observer avec le composé MR27770, que le traitement dans un milieu hypertonique n'a pas ou peu d'effet tandis que l'incubation avec le composé dans un milieu hypotonique augmente le gonflement des parasites et provoque leur éclatement de façon plus rapide que dans un milieu de tonicité normale. Le même phénotype est observé pour les inhibiteurs de gibbérelines (Toyama *et al.*, 2012). MR27770 pourrait donc éventuellement induire une déstabilisation des membranes tout au long du cycle parasitaire.
- Les **inhibiteurs de la digestion de l'hémoglobine** augmentant le volume de la vacuole digestive qui est, soit de la même couleur que l'hématie (inhibition des protéases en amont de la voie métabolique) ou qui n'est pas colorée au Giemsa (inhibition des peptidases en aval de la voie métabolique). Cependant, ces composés ont été décrits pour exercer leur action essentiellement au stade trophozoïte (Bailly *et al.*, 1992; Harbut *et al.*, 2011) ce qui n'est pas le cas de MR27770.

Les mécanismes décrits qui induisent un gonflement du parasite impliquent donc essentiellement des canaux ioniques ou de petits métabolites — comme le lactate — impliqués dans l'homéostasie parasitaire ou encore l'inhibition de la synthèse des stérols qui implique une déstabilisation de la membrane du parasite. Dans tous les cas, un afflux d'eau, dû à une osmolarité supérieure du milieu intracellulaire, induit le gonflement du parasite. Nous pouvons aussi imaginer qu'une ouverture des aquaporines pourrait avoir le même effet (Von Bülow and Beitz, 2015).

Un autre mécanisme qui a été évoqué pour différents flavonoïdes (flavones, isoflavonoïdes, chalcones) dans la bibliographie est une induction de l'apoptose suite à la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui vont provoquer l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale et induire ainsi un gonflement de la mitochondrie qui peut occuper une grosse partie du volume du parasite. Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre introductif**, l'effet pro- ou anti-oxydant des flavonoïdes dépend de leur structure et implique des fonctions hydroxyles libres, ce qui n'est pas le cas de nos composés qui sont polyméthoxylés.

Un mécanisme a été décrit récemment dans ce sens lorsque la chloroquine est utilisée à forte concentration et peut ainsi surmonter le mécanisme de résistance du parasite en saturant *PfCRT*. En effet, pour des concentrations micromolaires, la chloroquine s'accumule de façon importante dans la vacuole digestive et provoque la perméabilisation de sa membrane. Cela provoque la libération des protéases responsables de la digestion de l'hémoglobine dans le cytoplasme ce qui induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale, une fragmentation de l'ADN et une mort cellulaire. Ce mécanisme est très proche de la mort par autophagie observée chez les cellules de mammifères (due à un relargage cytoplasmique du contenu des lysosomes). De plus, cet effet est observé après seulement quatre heures de traitement (Ch'ng *et al.*, 2015). L'observation de noyaux pycnotiques chez les parasites traités par MR27770 nous indique que le traitement induit probablement un phénomène d'apoptose, reste à savoir par quel biais ce phénomène est induit. MR27770 implique probablement soit l'inhibition d'un canal ionique ou exportant de petits métabolites, soit une perte directe ou indirecte de l'intégrité d'une ou des membranes du parasite (membrane plasmique, mitochondriale, lysosomale) menant à un gonflement. Il a été décrit que la perte de l'homéostasie cellulaire mène à l'apoptose (Rathore *et al.*, 2015), ce qui pourrait expliquer l'effet pro-apoptotique éventuel de MR27770. Plusieurs marqueurs pourraient nous permettre de mettre en évidence un effet pro-apoptotique : le composé fluorescent JC-1 dont la longueur d'onde d'émission de fluorescence varie en fonction du potentiel de membrane mitochondriale, l'utilisation d'anticorps anti-annexine V conjugués à un fluorophore pour mettre en évidence l'exposition membranaire de phosphatidyl-sérine (qui doit cependant être utilisée avec précaution étant donné qu'il a été montré que l'annexine V peut se lier de façon non spécifique à d'autres lipides chez *Leishmania*), et l'utilisation de colorant de Hoescht ou de la migration de l'ADN sur gel d'agarose par la méthode TUNEL pour mettre en évidence la fragmentation de l'ADN. Les protozoaires ne possèdent pas de caspases mais des cystéines-protéases appelées métacaspases qui participeraient aux phénomènes de mort cellulaire mais qui possèdent des substrats différents des caspases de mammifères (Proto *et al.*, 2013).

La synthèse d'un dérivé fluorescent de MR27770 nous permettra d'appréhender prochainement la localisation cellulaire de l'éventuelle cible.

Dans tous les cas, il a été décrit qu'un effet sur l'homéostasie cellulaire pouvait induire un effet sur les stades érythrocytaires asexués mais aussi sur les gamétocytes (Maron *et al.*, 2015). Il sera donc intéressant d'évaluer l'activité de MR27770 vis-à-vis des stades sexués de *Plasmodium* (collaboration envisagée : S. Blandin, IBMC, Strasbourg).

Concernant l'effet de MR27770 en combinaison avec des antipaludiques de référence, il est difficile de conclure que l'effet observé est forcément dû au mécanisme d'action des composés testés dans la combinaison. D'après Bell *et al.*, plusieurs effets peuvent augmenter ou diminuer l'efficacité d'une combinaison sans pour autant impliquer la cible. Par exemple, un effet synergique entre deux

composés peut être dû à **(i)** une liaison à la même cible qui implique que la liaison de la molécule A induit un changement conformationnel qui augmente la liaison de la molécule B, **(ii)** la liaison de la molécule A à un transporteur qui augmente l'absorption du composé B dans la cellule ou le compartiment intracellulaire où il exerce son action, **(iii)** la formation d'un complexe entre A et B qui augmente leur toxicité, **(iv)** la molécule A qui induit l'augmentation de la conversion de la molécule B en une forme plus active, etc (Bell, 2005). De plus, l'effet observé *in vitro* n'est pas forcément conservé dans un modèle animal, les paramètres pharmacocinétiques des composés jouant un rôle prépondérant.

Pour expliquer l'effet de MR27770 en combinaison avec les antipaludiques courants, si le gonflement implique un afflux d'eau ou un efflux d'ions, cela pourrait modifier le pH au sein du cytoplasme ou de la vacuole digestive, ce qui aurait pour conséquence de diminuer la concentration de chloroquine au sein de cette organelle expliquant l'effet tendant vers l'antagonisme. De plus, dans l'hypothèse où MR27770 déstabiliserait les membranes — par analogie au mécanisme induit par les inhibiteurs de la voie des gibbérelines (Toyama *et al.*, 2012) — cela pourrait augmenter l'efflux de certains composés. Ces hypothèses devront bien sûr être confirmées lorsque le mécanisme d'action sera connu. L'artémisinine ayant un mécanisme d'action rapide, elle est peut-être moins susceptible à une modification de l'environnement causé par MR27770.

La synthèse de dérivés permettant la liaison de MR27770 à une résine afin de mettre en évidence la cible par chémoprotéomique ciblée permettra peut-être d'en apprendre plus sur le mécanisme d'action de ces composés.

Etude de relation structure-activité

Enfin, nous avons évalué l'activité de dérivés de MR27770 afin d'optimiser son activité. Nous ne nous sommes pas facilités la tâche en utilisant deux méthodes de screening conduisant à des résultats radicalement différents pour certains composés. En effet, le fait d'utiliser deux souches différentes, deux milieux de culture différents et deux tests différents (incorporation de l'hypoxanthine tritiée et immunodétection de la pLDH) a certes compliqué l'interprétation des résultats mais a notamment permis de sélectionner des composés d'intérêt qui n'auraient pas été retenus sur la base d'un seul test.

Les conditions de culture utilisées à Strasbourg ont été mises au point par un partenaire industriel pour obtenir de fortes parasitémies en culture. Une croissance parasitaire accrue peut induire une CI_{50} plus élevée. De plus, l'utilisation d'un sérum de veau (*alpha-calf serum*) peut induire une modification du contenu en lipides par rapport au milieu standard contenant de l'albumax-II ou du sérum humain. Si le composé induit une déstabilisation des membranes et que celles-ci sont stabilisées par la présence de lipides essentiels dans le milieu de culture, cela pourrait expliquer la différence d'effet observé. Après avoir pris contact avec le fournisseur, nous n'avons pas réussi à obtenir d'informations quant à la

composition exacte de ce sérum de veau et donc aux éventuelles différences avec du sérum humain. De plus, nous utilisons moins d'HEPES (10 mM contre 25 mM dans le test hypoxanthine tritiée à Bâle) ce qui peut éventuellement expliquer les différences de solubilité de certains composés. Enfin, notre milieu est supplémenté en pyruvate de sodium (110 mg/L) et en L-glutamine (1 mM) qui servent de source énergétique au parasite et pourraient éventuellement compenser l'effet induit par les composés MR.

Les deux tests présentent également des caractéristiques différentes, l'un mettant en évidence la synthèse d'acides nucléiques du parasite (incorporation de l'hypoxanthine tritiée), l'autre l'export d'une protéine (immunodétection de la pLDH). En effet, il a été décrit que les composés ne présentant pas un mode d'action artésunate-like, c'est-à-dire rapide, pouvaient avoir des CI_{50} discordantes entre les deux tests (Wein *et al.*, 2010) et pourrait expliquer, du moins en partie, la différence d'effet observé.

Les souches ne semblent pas jouer de rôle prépondérant dans la différence d'activité mise en exergue étant donné que l'activité de MR27770 et de certains analogues évalués vis-à-vis des souches K1 et 7G8 est conservée dans un même test (immunodétection de la pLDH, **Chapitre 3**).

Le but de l'étude de relation structure-activité était **i)** de réduire le nombre de groupements méthoxyles qui contribuent à la lipophilie de la molécule et qui sont susceptibles d'augmenter son élimination *in vivo* ; **ii)** d'évaluer l'importance de la position et de la nature du substituant en position 8 ; **iii)** de substituer l'alcyne en position 8, synonyme de toxicité.

Concernant les méthoxyles, nous avons vu que les supprimer ou les substituer par des chlores ou des groupements O-benzyles diminuait la sélectivité des composés. De plus, l'importance des méthoxyles en positions 5 et 7 pour la stabilité métabolique des flavones *in vivo* a été décrite dans la littérature (Griffiths and Smith, 1972). La stabilité métabolique de MR27770 observée *in vivo*, si celle-ci est effectivement confirmée par une faible clairance intrinsèque *in vitro*, pourrait amener à tolérer les méthoxyles, en faisant même une des clés de la biodisponibilité inattendue de cette flavone.

Concernant l'alcyne, sa saturation ou son remplacement mène à une perte d'activité (saturation) ou de sélectivité (remplacement par un cycle). En effet, les cycles liés directement au cycle A en position 8 diminuent l'activité ou augmentent la toxicité des composés.

Ainsi l'alcyne semble important à l'activité de même que la présence d'un atome d'azote faiblement basique. Les deux méthoxyles portés par le cycle B en positions 3' et 4' sont quant à eux importants pour la sélectivité.

Les dérivés de flavone sont environ deux fois plus actifs sur les souches résistantes à la chloroquine que sur les souches sensibles (dans la limite des composés évalués). Il a été montré que l'expression

du gène *pfcr*, dont la mutation est responsable de la résistance à la chloroquine, a un effet sur le pH intracellulaire, le mutant *PfCRT* induisant un pH plus acide au sein de la vacuole digestive que la protéine *wild-type* (Valderramos and Fidock, 2006). Il est possible que le pH ait un effet sur l'efficacité des dérivés de MR27770, car ce sont des bases faibles comme la chloroquine, et ils pourraient s'accumuler éventuellement dans ce compartiment. A nouveau, l'utilisation d'un analogue de MR27770 rendu fluorescent, dont la conception est actuellement en cours au laboratoire, nous informera sur ce point.

Parmi les composés dont l'activité a été nettement améliorée *in vitro*, le dérivé LPI3363, bien que trois à quarante fois plus actif que MR27770 selon la souche considérée, pêche par une élimination rapide *in vivo* (clairance environ 10 fois plus élevée) et une action beaucoup plus lente (environ 60 heures sont nécessaires pour éliminer 99 % de la charge parasitaire initiale), ce qui explique vraisemblablement l'inactivité de ce composé à la dose de 50 mg/kg chez la souris infectée. La différence de cinétique d'action entre les deux composés suggère que ceux-ci ne partagent pas le même mécanisme d'action (Sanz *et al.*, 2012). Cependant, LPI3363, tout comme MR27770, cible tous les stades du cycle de 48 heures et induit le même phénotype de vacuolisation du parasite, bien qu'un temps d'incubation plus long soit nécessaire pour observer cet effet. Ce phénotype est suffisamment rare pour conclure que les deux composés semblent partager un mécanisme d'action commun. La différence d'activité peut éventuellement s'expliquer par la présence d'un BOC pour le composé LPI3363, annulant totalement le caractère basique de l'amine. Ce groupement protecteur lipophile pourrait permettre au composé de traverser plus facilement les membranes et serait éliminé à pH acide au sein de la vacuole digestive, après quoi le composé déprotégé pourrait induire son effet. Cette action de type prodrogue pourrait éventuellement expliquer la différence de cinétique d'action entre les deux composés. Cette hypothèse serait cependant à démontrer.

Le composé LPI3279, bien qu'initialement écarté pour sa toxicité *in vitro*, pourrait représenter une alternative intéressante. En effet, c'est le composé le plus actif obtenu vis-à-vis de la souche K1 (test d'inhibition de l'hypoxanthine tritiée) avec une CI_{50} de 20 nM. De plus, il présente une courbe d'inhibition de la croissance parasitaire *in vitro* présentant la même allure que celle de MR27770. Ce composé pourrait donc potentiellement avoir un effet aussi rapide que celui de MR27770. De plus, sa structure très proche du composé chef-de-file pourrait permettre de maintenir le profil pharmacocinétique. Les données de RSA indiquent que la toxicité *in vitro* de ce composé 4'-méthoxylé pourrait être réduite par l'ajout d'un méthoxyle en position 3'.

L'étude de relation structure-activité devra se poursuivre dans ce sens afin d'améliorer l'activité *in vivo* tout en conservant le phénotype de MR27770, mais a d'ores et déjà permis de montrer qu'il est possible d'améliorer l'activité *in vitro* jusqu'à la dizaine de nanomolaire. La synthèse et la

caractérisation du dérivé pipéridiné de MR27770 devrait nous permettre d'améliorer sa sélectivité et de conserver les propriétés qui font l'intérêt de cette série chimique.

En conclusion, le composé chef-de-file MR27770 présente un phénotype à la fois inédit et prometteur, avec un mécanisme d'action potentiellement nouveau qui impliquerait un stress osmotique et induirait les voies de l'apoptose parasitaire. Le composé tête-de-série et la série chimique qui en découle viennent tout récemment d'obtenir le soutien de MMV, démontrant une fois de plus, s'il le fallait, l'intérêt de la série. La poursuite de l'étude de relation structure-activité et la compréhension du mécanisme d'action de ces composés nous permettra peut-être de développer une nouvelle série chimique dans l'arsenal antipaludique.

Bibliographie de la partie discussion et conclusion générale de l'étude

Bailly, E., Jambou, R., Savel, J., and Jaureguiberry, G. (1992). *Plasmodium falciparum*: differential sensitivity *in vitro* to E-64 (cysteine protease inhibitor) and Pepstatin A (aspartyl protease inhibitor). *J. Protozool.* *39*, 593–599.

Bell, A. (2005). Antimalarial drug synergism and antagonism: mechanistic and clinical significance. *FEMS Microbiol. Lett.* *253*, 171–184.

Buffet, P.A., Safeukui, I., Deplaine, G., Brousse, V., Prendki, V., Thellier, M., Turner, G.D., and Mercereau-Puijalon, O. (2011). The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood* *117*, 381–392.

Ch'ng, J.-H., Ursing, J., and Tan, K.S.-W. (2015). Microbial hara-kiri: Exploiting lysosomal cell death in malaria parasites. *Microb Cell* *2*, 57–58.

Fehintola, F.A., Akinyinka, O.O., Adewole, I.F., Maponga, C.C., Ma, Q., and Morse, G.D. (2011). Drug interactions in the treatment and chemoprophylaxis of malaria in HIV infected individuals in sub Saharan Africa. *Curr. Drug Metab.* *12*, 51–56.

Gollmack, A., Henke, B., Bergmann, B., Wiechert, M., Erler, H., Blancke Soares, A., Spielmann, T., and Beitz, E. (2017). Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the *Plasmodium* lactate transporter *PfFNT* at nanomolar scale. *PLOS Pathogens* *13*, e1006172.

Griffiths, L.A., and Smith, G.E. (1972). Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation *in vivo* and by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. J.* *128*, 901–911.

Hapuarachchi, S.V., Cobbold, S.A., Shafik, S.H., Dennis, A.S.M., McConville, M.J., Martin, R.E., Kirk, K., and Lehane, A.M. (2017). The Malaria Parasite's Lactate Transporter *PfFNT* Is the Target of Antiplasmodial Compounds Identified in Whole Cell Phenotypic Screens. *PLOS Pathogens* *13*, e1006180.

Harbut, M.B., Velmourougane, G., Dalal, S., Reiss, G., Whisstock, J.C., Onder, O., Brisson, D., McGowan, S., Klemba, M., and Greenbaum, D.C. (2011). Bestatin-based chemical biology strategy reveals distinct roles for malaria M1- and M17-family aminopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, E526-534.

Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., Krause, P.J., and Persing, D.H. (2000). Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* *13*, 451–469.

Jiménez-Díaz, M.B., Ebert, D., Salinas, Y., Pradhan, A., Lehane, A.M., Myrand-Lapierre, M.-E., O'Loughlin, K.G., Shackelford, D.M., Justino de Almeida, M., Carrillo, A.K., *et al.* (2014). (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, E5455-5462.

Lew, V.L. (2003). Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* *101*, 4189–4194.

Maron, M.I., Magle, C.T., Czesny, B., Turturice, B.A., Huang, R., Zheng, W., Vaidya, A.B., and Williamson, K.C. (2015). Maduramicin Rapidly Eliminates Malaria Parasites and Potentiates the Gametocytocidal Activity of the Pyrazoleamide PA21A050. *Antimicrob. Agents Chemother.* *60*, 1492–1499.

Proto, W.R., Coombs, G.H., and Mottram, J.C. (2013). Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 58–66.

Rathore, S., Datta, G., Kaur, I., Malhotra, P., and Mohammed, A. (2015). Disruption of cellular homeostasis induces organelle stress and triggers apoptosis like cell-death pathways in malaria parasite. *Cell Death Dis* 6, e1803.

Sanz, L.M., Crespo, B., De-Cózar, C., Ding, X.C., Llergo, J.L., Burrows, J.N., García-Bustos, J.F., and Gamo, F.-J. (2012). *P. falciparum In Vitro* Killing Rates Allow to Discriminate between Different Antimalarial Mode-of-Action. *PLoS ONE* 7, e30949.

van Schalkwyk, D.A., Chan, X.W.A., Misiano, P., Gagliardi, S., Farina, C., and Saliba, K.J. (2010). Inhibition of *Plasmodium falciparum* pH regulation by small molecule indole derivatives results in rapid parasite death. *Biochemical Pharmacology* 79, 1291–1299.

Toyama, T., Tahara, M., Nagamune, K., Arimitsu, K., Hamashima, Y., Palacpac, N.M.Q., Kawaide, H., Horii, T., and Tanabe, K. (2012). Gibberellin biosynthetic inhibitors make human malaria parasite *Plasmodium falciparum* cells swell and rupture to death. *PLoS ONE* 7, e32246.

Valderramos, S.G., and Fidock, D.A. (2006). Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 594–601.

Von Bülow, J., and Beitz, E. (2015). Number and regulation of protozoan aquaporins reflect environmental complexity. *Biol. Bull.* 229, 38–46.

Wein, S., Maynadier, M., Tran Van Ba, C., Cerdan, R., Peyrottes, S., Fraisse, L., and Vial, H. (2010). Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1651–1660.

Partie méthodologique

Partie méthodologique

A . Synthèse bibliographique flavonoïdes et paludisme

La synthèse bibliographique a été réalisée à partir de différentes bases de données : *Web of Science* et *PubMed*. Les mots clés utilisés ont été tronqués (*) pour permettre une recherche au sens large. Ainsi le mot clé *flav* a permis de couvrir la recherche pour les flavonoïdes, les biflavonoïdes, les isoflavonoïdes, les flavones, les flavanones, les isoflavones, les isoflavanones *etc.* tandis que les mots clés *plasmodi* et *malaria* ont permis de couvrir les termes *Plasmodium*, *antiplasmodial*, *malaria* et *antimalarial*. La recherche par combinaison des termes *flav* + *plasmodi* et *flav* + *malaria* permet d'obtenir 433 + 568 résultats sur *Web of Science* et 72 + 65 résultats sur *PubMed*. Les publications ont ensuite été triées en fonction de la pertinence du résultat et les données qu'elles comportaient ont été classées en fonction de la sous-classe des molécules et de l'activité décrite vis-à-vis des différentes souches de *Plasmodium*, en tenant compte du test utilisé. La cytotoxicité vis-à-vis de cellules de mammifères a été répertoriée quand cette donnée était disponible.

B . Tests phénotypiques vis-à-vis de *P. falciparum*

1 . Culture de *P. falciparum*

La culture de *Plasmodium falciparum* est réalisée selon la méthode de Trager et Jensen décrite en 1976 (Trager and Jensen, 1976). *P. falciparum* étant un parasite intracellulaire strict, la culture doit être adaptée en conséquence. Ainsi, quatre facteurs essentiels doivent être présents : le milieu nutritif doit être adapté afin de fournir les nutriments nécessaires à la survie du parasite, la présence d'hématies étant donné que le parasite est intracellulaire strict, une atmosphère pauvre en oxygène (milieu anaérobie) obtenue grâce à un système appelé « candle jar » et une température physiologique de 37 °C. Le « candle jar » est un système composé d'un dessiccateur étanche dans lequel on fait brûler une bougie afin de consommer l'oxygène présent. L'ensemble des manipulations concernant la culture cellulaire sont réalisées dans des conditions stériles sous hotte à flux d'air laminaire.

i . Souches plasmodiales

Les dérivés synthétiques de la lanaroflavone ont été testés sur trois souches différentes de *P. falciparum* : la souche 7G8, multi-résistante (chloroquine, pyriméthamine et cycloguanil) d'origine brésilienne (Burkot *et al.*, 1984), la souche K1, multirésistante (chloroquine, pyriméthamine, cycloguanil et sulfadoxine) d'origine thaïlandaise (Thaithong and Beale, 1981) et la souche W2-mef multi-résistante (chloroquine, pyriméthamine, cycloguanil et sulfadoxine, méfloquine), clone de la souche W2 soumise à une pression continue de méfloquine (Oduola *et al.*, 1988).

ii . Préparation des hématies

L'emploi d'hématies est nécessaire pour recréer artificiellement le cycle intra-érythrocytaire du parasite. Les hématies sont issues de dons du sang de donneurs O⁺ n'ayant jamais été en contact avec le parasite (EFS, Strasbourg). Le contenu d'une poche de culot globulaire est transféré dans une flasque F175 et celui-ci est complété avec du milieu de conservation SAGM (*Saline Adenine Glucose Medium*) à raison de 1 volume de SAGM pour 2,5 volumes d'hématies. Les hématies ainsi traitées sont conservées 1 mois à +4°C.

Avant utilisation, les hématies sont lavées avec du RPMI et l'hématocrite (pourcentage de globules rouges par rapport au volume total) est ajustée à 50 %. Les échantillons ainsi reconstitués peuvent être conservés 5 jours à + 4 °C.

iii . « Milieu de culture Malaria » MCM

Le milieu est constitué d'un milieu de base RPMI 1640 additionné d'hypoxanthine (1 mg/l ; nécessaire à la croissance du parasite qui est incapable de réaliser la synthèse *de novo* de ce précurseur des bases puriques), de L-glutamine (1 mM ; source énergétique pour la glycolyse anaérobie), de pyruvate de sodium (110 mg/l) et est tamponné à 7,4 (pH physiologique) par un tampon HEPES (10 mM). Un antibiotique, la gentamicine, y est ajouté afin d'éviter une éventuelle contamination bactérienne (20 mg/l). Enfin une fraction de sérum de veau (α -calf) est ajoutée à hauteur de 10 %. Ce milieu est appelé « Milieu de Culture Malaria » ou MCM complet.

iv . Décongélation de la souche et mise en culture

Les érythrocytes infectés par *Plasmodium* sont conservés dans l'azote liquide dans une solution qui permet de conserver l'intégrité des cellules sanguines qui les contiennent (solution d'Alsever). Afin de les remettre en culture, ces souches doivent être décongelées de façon rapide (1 à 2 minutes dans un bain-marie à 37 °C). Le volume de sang décongelé (V) est ensuite additionné goutte à goutte de 0,1 x V de solution de NaCl à 12 %. Ce mélange est incubé 5 minutes à température ambiante. Une deuxième solution moins concentrée de NaCl (1,6 %) est ensuite ajoutée goutte à goutte à raison de 10 x V. Cette étape permet d'éviter un choc osmotique qui entrainerait la lyse des globules rouges et donc la mort du parasite. Le tube est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 425 g à 20°C et le surnageant est éliminé. Les hématies du culot sont remises en suspension dans 10 x V de MCM doucement et goutte à goutte puis centrifugées à nouveau. Le culot est alors repris dans 5 ml de MCM et cette suspension parasitaire est transférée dans une flasque de culture F25. Des hématies fraîches et du milieu de culture sont ensuite ajoutés de manière à obtenir un hématocrite de 2% (0,2 ml d'hématies dans 10 ml de MCM). La flasque est mise à incuber en « *candle jar* » placé dans un incubateur à 37°C. La parasitémie (pourcentage d'hématies infectées par rapport au nombre total de globules rouges) est évaluée régulièrement par la lecture d'un frottis sanguin afin d'apprécier la croissance de la souche.

v. Frottis sanguin

Le frottis sanguin est une couche monocellulaire de cellules sanguine qui permet entre-autres de calculer la parasitémie de *Plasmodium*. Il est réalisé par étalement d'une goutte de sang sur une lame à l'aide d'une lamelle. Le frottis doit ensuite être séché rapidement afin d'éviter la formation d'échinocytes (globules rouges déformés se présentant sous une forme épineuse). Il est ensuite fixé au méthanol et coloré au Giemsa 10 % pendant 20 à 30 min. Cette technique de coloration permet de donner une couleur caractéristique au parasite (noyau rose et cytoplasme bleu). La lame est ensuite lue au microscope à l'objectif à immersion (X 100). Le nombre d'hématies parasitées est alors compté sur 30 champs homogènes et rapporté au nombre total d'hématies comptées dans ces champs.

vi. Division

En fonction de la parasitémie et des stades présents, deux alternatives se présentent :

- Entre 1 et 4 % de parasitémie dont majoritairement des trophozoïtes, le milieu est changé et ramené à un **hématocrite de 1 %**
- Si la forme schizonte est majoritaire et la parasitémie supérieure à 2%, ou que la parasitémie est supérieure à 4%, il faut réaliser une division de la culture afin de la ramener à une **parasitémie de 0,5 à 1 %**.

vii. Congélation

Les hématies doivent être parasitées majoritairement par des formes rings présentes à une parasitémie d'environ 3 à 4 %. Le culot d'hématies parasitées est repris volume à volume dans une solution de congélation (solution d'Alsever) contenant du glycérol (28 % v/v), du sorbitol (3 % m/v) et du NaCl (0,65 % m/v), préalablement filtrée sur une membrane de 0,22 µm.

2. Tests de chimiosensibilité de *Plasmodium*

i. Réalisation des gammes de concentration des composés à tester

Les gammes de concentrations sont réalisées dans une solution de MCM à 1 % de DMSO (diméthyl sulfoxide). Une solution mère à 20 mg/ml est préparée dans du DMSO pur afin de permettre une dilution optimale des composés. Celle-ci est ensuite diluée au 1/100^{ème} avec du MCM sans sérum de façon à obtenir une solution à 200 µg/ml présentant une concentration finale de DMSO de 1 %. Une dilution en cascade au 1/3 de cette solution à 200 µg/ml est réalisée directement dans la plaque 96 puits : 50 µl sont transférés en cascade du premier puits (contenant 150 µl de solution à 200 µg/ml) dans les puits suivants contenant 100 µl de MCM sans sérum à 1 % de DMSO et ce jusqu'au puits G où les 50 µL en excès sont jetés ce qui ramène tous les puits à un volume final de 100 µl. Les puits de la ligne H servent de puits contrôle. Cette dilution en cascade permet d'obtenir une gamme de 7 concentrations allant de 200 à 0,276 µg/ml. L'ajout de 100 µl/puits de suspension parasitaire diluée au ½ les concentrations et ramène la gamme à une concentration allant de 100 µg/ml à 0,138 µg/ml

dans 0,5 % de DMSO. Les gammes sont adaptées si besoin afin que la CI_{50} soit proche de la concentration médiane de la gamme. La chloroquine, molécule de référence, sert de contrôle positif sur une gamme de concentration allant de 500 ng/ml à 0,69 ng/ml. Chaque concentration est testée en triplicata.

ii . Réalisation de la suspension parasitaire

La culture de *P. falciparum* est ajustée à une parasitémie de 1 % et 4 % d'hématocrite dans du MCM complet en fonction du volume nécessaire pour la réalisation des tests. Une fois dilué au ½ dans le puits (volume de solution du composé à évaluer), l'hématocrite aura une valeur de 2%.

Dans chaque plaque deux contrôles sont ajoutés :

- Un puits de suspension globulaire à 2 % d'hématocrite dans 0,5 % de DMSO (contrôle négatif de croissance)
- Les puits de suspension parasitaire dans 0,5 % de DMSO (ligne H, contrôles positifs de croissance).

Ces contrôles serviront à déterminer le pourcentage d'inhibition de chaque puits, calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = 100 - \left(\frac{(DO_{\text{moyenne produit}} - DO_{GRS})}{DO_{\text{moyenne GRP}}} \times 100 \right)$$

Les plaques sont mises à incuber pendant 96 heures à 37 °C en *candle jar*.

iii . Quantification de la *Plasmodium* Lactate DeHydrogenase (pLDH)

La production de pLDH par le parasite est un reflet de sa **viabilité**. Cette enzyme est quantifiée par une méthode immuno-enzymatique à l'aide du kit ELISA Malaria Antigen test (ApDia®, Turnhout, Belgique). Dans ce test, c'est la souche multi-résistante 7G8 qui est employée.

Après 96 heures d'incubation, 5 µl de surnageant des puits sont transférés dans les puits correspondants des plaques 96 puits du kit ELISA, préalablement remplis avec 100 µl de tampon de lyse. Le fond des puits est recouvert d'anticorps monoclonaux anti-pLDH pan-spécifiques (qui reconnaissent toutes les espèces de *Plasmodium*). Les contrôles du test ELISA sont également ajoutés dans quatre puits :

- un puits contenant le contrôle positif (sérum humain contenant une quantité détectable de protéine recombinante pLDH)
- trois puits contenant le contrôle négatif (sérum humain contenant une quantité non détectable de recombinant pLDH)

La plaque est alors mise à incuber pendant 60 minutes à 37 °C sous agitation. A l'issue de l'incubation, les puits sont lavés 3 fois à l'aide d'une solution de lavage à base de tampon phosphate puis 100 µl d'une solution d'anticorps monoclonaux anti-pLDH (pan-spécifique) et biotinylés sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée 30 minutes à 37 °C avant d'être soumise à une nouvelle opération de lavage. 100 µl d'une solution de streptavidine-*horseradish* peroxydase sont alors ajoutés dans chaque puits et la plaque est mise à incuber 15 minutes à 37°C. La plaque est ensuite lavée à nouveau et 100 µl de solution chromogène « 2 en 1 » [peroxyde d'hydrogène (substrat) + 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, TMB, molécule chromogène] sont ajoutés. Une dernière incubation de 15 minutes à 37 °C, à l'abri de la lumière permet l'oxydation du TMB (incolore) par l'O₂ produit par la catalyse du peroxyde d'hydrogène, en produit de couleur bleue (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diimine). La réaction est ensuite stoppée par adjonction de 50 µl d'une solution d'acide sulfurique (0,5 M) qui induit une coloration jaune du produit et l'absorbance est lue dans les 15 minutes au spectrophotomètre à 450 nm. Chaque expérimentation est renouvelée une fois voire deux si nécessaire (n= 2 à 3).

iv . Détermination de la CI₅₀

La détermination de la concentration inhibitrice 50 se réalise par une méthode graphique à partir des courbes effet-dose qui sont des sinusoïdales (l'activité est très faible à une certaine dose puis augmente rapidement avec celle-ci pour atteindre un plateau d'inhibition). La CI₅₀ est la concentration qui permet d'inhiber 50 % de la croissance du parasite. Elle est calculée précisément à l'aide de GraphPad Prism 6 qui calcule l'interpolation linéaire entre les deux concentrations de drogues encadrant le 50 %.

v . Test d'inhibition de l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée

Le test d'inhibition de l'incorporation de l'³H-hypoxanthine est une technique radioisotopique décrite initialement par Desjardins *et al.* en 1979 (Desjardins *et al.*, 1979). Ce test, contrairement au test pLDH permet de mettre en évidence une inhibition de **la division plasmodiale** étant donné que l'³H-hypoxanthine est un précurseur de base purique indispensable à la synthèse nucléique du parasite. Ainsi l'³H-hypoxanthine est transformée en ³H-adénine ou ³H-guanine qui sont incorporées à l'ADN ou l'ARN du parasite. Le test consiste, comme pour le test pLDH, à mettre en présence une gamme de concentration du composé à tester avec une suspension parasitaire. Dans ce test, c'est la souche de *P. falciparum* K1 qui est employée. Après 48 heures d'incubation à 37°C et en atmosphère anaérobie, l'³H-hypoxanthine est additionnée à chaque puits et l'incubation est poursuivie pendant encore 24 heures dans les mêmes conditions. L'incorporation de radioactivité est évaluée après lyse des hématies à l'aide d'un scintillateur (coups par minute, cpm). La substance de référence utilisée est la chloroquine. Ce test est réalisé en collaboration avec le Dr M. Kaiser du *Swiss Tropical and Public Health Institute* de Bâle, plateforme de référence mondiale pour l'évaluation de la chimiosensibilité de parasites protozoaires, qui dispose des autorisations nécessaires pour la détention et l'utilisation de

produits radioactifs. Chaque concentration est testée en triplicata (7 concentrations, dilution au 1/3 de 90 à 0,123 µg/ml). Chaque expérimentation est renouvelée 1 fois (n= 2).

vi . Intérêt de combiner les deux techniques

L'intérêt de mesurer l'activité anti-*Plasmodium in vitro* en utilisant parallèlement les deux techniques est que l'on mesure deux paramètres différents. Or les tests antiplasmodiaux *in vitro* discriminent entre les différents composés criblés en fonction de leur mécanisme d'action antiplasmodiale (Wein *et al.*, 2010). Le test hypoxanthine permet de mesurer l'impact du composé sur la division parasitaire tandis que le test ELISA pLDH permet de déterminer l'impact sur la survie du parasite. La pLDH étant une enzyme présentant une demi-vie longue par rapport au temps d'incubation du parasite avec les composés (demi-vie d'environ 30 heures vs test de 72 heures), les composés entraînant une mort lente du parasite pourraient ne pas être détectés car la CI_{50} mesurée serait plus élevée que la CI_{50} réelle (Wein *et al.*, 2010). De plus, le milieu de culture utilisé à Strasbourg ayant été développé par un partenaire industriel pour augmenter la croissance parasitaire et obtenir une parasitémie élevée, les résultats de CI_{50} peuvent également être augmentés. Il était donc important de confirmer les résultats obtenus à Strasbourg avec le test de référence utilisé à Bâle. En effet, dans nos mains, les activités mesurées par ces deux techniques ne conduisent pas toujours aux mêmes résultats : les touches sont en général communes mais peuvent également être exclusives de l'un des deux tests.

3 . Etude de combinaisons thérapeutiques selon la méthode des isobologrammes

Le but de cette expérience est de mettre en évidence l'effet de la combinaison de deux composés antiplasmodiaux sur l'activité antiplasmodiale globale (synergique, additif ou antagoniste). Pour cela, des gammes de concentrations de deux composés sont mises en présence l'une de l'autre dans la culture plasmodiale et la CI_{50} de chaque composé est déterminée en présence et en l'absence de l'autre composé. La CI_{50} du composé A est déterminée en présence (A_B) et en absence (A) du composé B et inversement (Fivelman *et al.*, 2004). Cela permet de calculer les CI_{50} fractionnelles (FIC) de chaque association qui se définissent comme suit :

$$FIC(A_B) = \frac{CI_{50}(A_B)}{CI_{50}(A)} \quad \text{et} \quad FIC(B_A) = \frac{CI_{50}(B_A)}{CI_{50}(B)}$$

Ces CI_{50} fractionnelles sont égales supérieures ou inférieures à 1 et déterminent respectivement l'effet additif, antagoniste ou synergique, d'une combinaison à une concentration donnée. La représentation graphique des FIC de A en fonction des FIC de B permet de tracer l'isobogramme et de décrire l'effet de la combinaison (Berenbaum, 1978). Les gammes utilisées pour évaluer l'effet de MR27770 avec la dihydroartémisinine, la chloroquine, la méfloquine, l'atovaquone et la pyriméthamine sont représentées dans le **Tableau 28**. Les dilutions sont réalisées en cascade au 1/2 d'une gamme comprenant sept points.

Tableau 28. Concentrations utilisées pour évaluer l'effet de combinaisons entre MR27770 d'une part et la dihydroartémisinine, la chloroquine, la méfloquine, l'atovaquone et la pyriméthamine d'autre part. Les concentrations indiquées représentent les valeurs haute et basse d'une gamme de 7 points diluées au 1/2.

Composés	Concentration haute (nM)	Concentration basse (nM)
MR27770	10 000	156
Dihydroartémisinine	25	0,4
Chloroquine	100	1,6
Méfloquine	50	0,8
Atovaquone	5	0,08
Pyriméthamine	2 000	31,2

Ces manipulations ont été réalisées avec la souche 7G8 et ont été réalisées au moins deux fois de façon indépendante.

4. Synchronisation des souches de *P. falciparum*

En culture asynchrones (Paragraphe B. 1. Culture de *P. falciparum*), tous les stades sanguins du parasite sont présents simultanément. Il existe plusieurs techniques pour synchroniser la culture, de façon à n'étudier qu'un stade de développement à la fois, deux étant principalement utilisées au laboratoire.

i. Synchronisation au sorbitol : sélection des anneaux

a. Principe

La synchronisation au sorbitol tire parti du fait qu'après l'invasion de l'érythrocyte, *Plasmodium* va mettre en place des « *new permeability pathways* » (NPP) c'est-à-dire qu'il va exporter des protéines à la membrane de l'érythrocyte et de la vacuole parasitophore pour former des canaux permettant l'import des nutriments dont il a besoin et l'export des déchets métaboliques qu'il produit en grande quantité comme le lactate. La plupart des protéines responsables de ces imports sont des canaux peu spécifiques qui laissent passer de nombreux métabolites de petit poids moléculaire, dont le sorbitol. Le traitement de la culture au sorbitol va par conséquent induire une lyse osmotique sélective des stades présentant ces NPP (à partir du stade trophozoïte) tandis que les stades les plus jeunes (anneaux) et les globules rouges non parasités ne seront pas affectés.

b. Protocole

Les solutions (sorbitol 5 %, MCM complet) sont préalablement préchauffées à 37 °C. Les globules rouges parasités sont remis en suspension dans la flasque et centrifugés à 2500 rpm à 20 °C pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 10 ml de sorbitol 5 %. Le mélange est incubé pendant 10 min à 37 °C. Le tout est ensuite homogénéisé au vortex puis centrifugé (2500 rpm, 20 °C, 5 min), le surnageant est éliminé et le culot est repris dans du milieu complet et remis en culture.

ii . Synchronisation au Percoll 70% : sélection des schizontes

a . Principe

La synchronisation au Percoll permet de concentrer les hématies infectées par des parasites au stade schizonte qui sont moins denses que les hématies parasitées par des stades plus jeunes car une grande partie de l'hémoglobine a été digérée par le parasite (Rivadeneira *et al.*, 1983). Ces hématies vont donc rester en surface du Percoll après centrifugation tandis que les hématies infectées par des stades jeunes vont précipiter dans le culot.

b . Protocole

La culture est synchronisée au sorbitol puis remise à incuber pendant 30 heures afin d'obtenir plus de stades matures lors de la manipulation. La culture est ensuite centrifugée, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 4 ml de RPMI à 15 U/ml d'héparine et incubé à 37°C pendant 15 min. 3,8 ml d'un mélange 90 % percoll / 10 % PBS x 10 sont placés dans un tube eppendorf 15 ml et 750 µl de RPMI à 15 U/ml d'héparine sont ajoutés. Le tube est centrifugé afin d'éliminer les gouttes qui pourraient rester sur les parois. Après les 15 min d'incubation, la suspension parasitaire est déposée délicatement à la surface du Percoll et le tube est centrifugé 15 min à 2500 rpm. L'anneau se formant à la frontière entre le RPMI et le Percoll contient les formes matures : il est récupéré et rincé avec du RPMI puis remis en culture dans 10 ml de MCM et 200 µl d'hématies fraîches sont ajoutés.

iii . Synchronisation 0 - 3 heures

Après synchronisation au Percoll, les schizontes sont remis en culture pour 3 heures afin que les mérozoïtes résultant de l'éclatement des schizontes puissent envahir de nouvelles hématies. Après 3 heures d'incubation, la culture est synchronisée au sorbitol 5 % afin de sélectionner les stades anneaux âgés de 0 à 3 heures post-invasion.

5 . *Ring-stage Survival Assay*

La CI_{50} des souches résistantes à l'artémisinine n'étant pas corrélée à la réalité clinique, un test appelé *Ring-stage Survival Assay* (RSA) a été mis au point au laboratoire de l'Institut Pasteur du Cambodge (Witkowski *et al.*, 2013). Une synchronisation 0 – 3 heures est réalisée car seuls les stades anneaux jeunes sont résistants à l'artémisinine. Les composés à action rapide sont évalués *via* ce test et comparés à la dihydroartémisinine (DHA), métabolite actif des dérivés de l'artémisinine. Le choix de la concentration de 880 nM de DHA a été fait sur la base de la concentration plasmatique maximale mesurée chez les patients traités d'un composé évalué en parallèle de mes manipulations sur MR27770, il s'agit de l'OZ439. Un contrôle à la même concentration de DMSO (0,1 %) est réalisé en parallèle. La parasitémie est ajustée à 1 % et l'hématocrite à 2 % et la suspension parasitaire enrichie en formes anneaux 0 – 3 heures ainsi obtenue est répartie dans des plaques 48 puits (1 ml/puits). Ces plaques sont mises à incuber à 37 °C sous atmosphère appauvrie en oxygène pendant 6 heures (temps d'incubation basé sur la demi-vie de la DHA) puis le contenu des puits est centrifugé et le culot est repris dans 10 ml de RPMI (afin d'éliminer la molécule à l'essai). Le tube est centrifugé à nouveau, le

RPMI éliminé et le culot est repris dans 1 ml de MCM puis remis en culture. Un frottis est réalisé pour chaque puits à 72 heures afin d'évaluer la parasitémie. Le paramètre RSA, représentant le pourcentage de croissance par rapport au contrôle DMSO, est calculé comme suit :

$$RSA = \frac{\text{Parasitémie dans le puits traité}}{\text{Parasitémie dans le puits contrôle}} \times 100$$

Plus la RSA est élevée, plus le parasite est résistant à la DHA.

6 . *Piperaquine Survival Assay*

De même, la CI_{50} des souches résistantes à la pipéraquline n'est pas corrélée à la réalité clinique. Un test analogue au test RSA, appelé *Piperaquine Survival Assay* (PSA) permet de mettre en évidence les souches résistantes à la pipéraquline (Duru *et al.*, 2015). Il est réalisé de la même façon que le test RSA excepté la molécule utilisée (pipéraquline 200 nM *versus* contrôle acide lactique 0,0005 %) et le temps d'exposition de 48 heures (la pipéraquline présentant une demi-vie d'environ 9 jours, les parasites sont exposés pendant un cycle de 48 heures). Un frottis est réalisé pour chaque puits à 72 heures afin d'évaluer la parasitémie. Le paramètre PSA, représentant le pourcentage de croissance par rapport au contrôle acide lactique, est calculé comme suit :

$$PSA = \frac{\text{Parasitémie dans le puits traité}}{\text{Parasitémie dans le puits contrôle}} \times 100$$

Plus la PSA est élevée, plus le parasite est résistant à la pipéraquline.

7 . *Evaluation de la chimiosensibilité des différents stades sanguins de P. falciparum*

Afin d'évaluer la chimiosensibilité des différents stades sanguins de *P. falciparum*, une synchronisation 0 – 3 heures est réalisée avec la souche 7G8. Après la deuxième synchronisation, la parasitémie est ajustée à 0,5 – 1 % et l'hématorite à 2 % et la suspension parasitaire ainsi obtenue est répartie dans des plaques 24 puits (0,9 ml/puits) contenant suffisamment de puits pour pouvoir couvrir 16 périodes de temps pour chaque concentration à tester. Ces plaques sont mises à incuber à 37 °C en *candle jar* et le parasite peut donc évoluer dans le cycle. Les différents puits sont traités avec 100 µl d'une solution 10 fois plus concentrée du composé à évaluer, à t = 0 post-synchronisation puis toutes les 3 heures afin de cibler les différents stades de développement. Après chaque incubation de 3 heures, les puits correspondants sont récoltés, centrifugés et le culot de 20 µl est lavé avec 10 ml de RPMI afin d'éliminer le composé à tester. Les tubes sont centrifugés à nouveau et le culot est repris dans 1 ml de MCM complet, chaque point étant remis en culture dans un nouveau puits jusqu'à 72 heures post-synchronisation. A 72 heures, un frottis est réalisé pour chaque puits. La parasitémie est évaluée sur 10 000 hématies et rapportée à la parasitémie du contrôle DMSO (n = 2) pour déterminer le pourcentage de croissance parasitaire.

8 . Effet de MR27770 sur l'invasion

Plusieurs essais infructueux ont été réalisés pour purifier des mérozoïtes selon le protocole décrit par Boyle *et al.*, 2010 dont le but est de purifier des schizontes, inhiber leur éclatement par l'utilisation du composé E64 et filtrer les schizontes mûres sur un filtre de 1,2 µm afin de faire les faire éclater et de récolter les mérozoïtes. Le protocole a été suivi excepté pour la purification de schizonte qui fait appel au passage de la suspension parasitaire sur des billes magnétiques dans la publication de référence, que nous avons remplacé par une synchronisation au Percoll. Les essais réalisés ne nous ont pas permis d'obtenir une parasitémie détectable dans les puits contrôles et ce protocole a donc été abandonné.

Les schizontes purifiés par synchronisation au Percoll — à partir de 500 µl d'hématies parasitées par environ 0,3 % de schizontes, souche 7G8 — ont été repris dans 1 ml de milieu de culture, 100 µl de cette suspension ont été répartis dans des puits d'une plaque 24 puits. 800 µl d'une suspension globulaire à 1 % d'hématocrite ainsi que 100 µl d'une solution 10 x concentrée du produit à tester (ou du contrôle DMSO) ont été ajoutés dans les puits correspondants, en duplicata. Pour les globules rouges prétraités, les hématies saines ont été mises en contact avec les composés à tester ou un contrôle DMSO pendant 30 min, et lavés deux fois par 20 x le volume de RPMI. Ces globules rouges ont été utilisés pour réaliser la suspension globulaire des puits correspondants, où 900 µl de suspension à 1 % d'hématocrite a été mise en contact avec 100 µl de suspension de schizontes. Les plaques contenant les différents puits ont été mises en culture pour 3 heures afin que les mérozoïtes résultant de l'éclatement des schizontes puissent envahir de nouvelles hématies. Après 3 heures d'incubation, un frottis est réalisé pour chaque puits et le pourcentage d'anneaux et de schizontes est mesuré sur chaque frottis par rapport à plus de 6000 hématies. Lors des deux manipulations indépendantes réalisées, la parasitémie obtenue dans les puits contrôles était d'environ 0,8 %.

9 . Evaluation de l'effet de MR27770 en milieu hyper- et hypotonique

Protocole adapté d'après (Toyama *et al.*, 2012). La souche 7G8 asynchrone à une parasitémie de 3 à 5 % a été utilisée. Deux manipulations indépendantes ont été réalisées en duplicata.

i . Milieu hypertonique (PBS)

0,8 ml de culture asynchrone à 2 % d'hématocrite ont été répartis dans les puits d'une plaque 24 puits. 100 µl de PBS 1 x, 2,5 x ou 5 x concentré sont ajoutés dans les puits correspondants. 100 µl d'une solution 10 x concentrée de MR27770 (concentration finale de 10 µM) ou de son contrôle DMSO sont répartis dans les puits de chaque condition. Un frottis de chaque puits est réalisé après 3 heures d'incubation à 37 °C en atmosphère anaérobie.

ii . Milieu hypotonique (H₂O milliQ)

0 ml, 0,25 ml et 0,5 ml d'H₂O milliQ stérile ont été ajustés à 0,5 ml avec du MCM complet. 500 µl de chaque condition ont été mis en contact avec 400 µl de suspension parasitaire à 2 % d'hématocrite et

100 µl de MR27770 x 10 ou de son contrôle DMSO. Un frottis de chaque puits est réalisé après 3 heures d'incubation à 37 °C en atmosphère anaérobie.

Dans les deux cas, la parasitémie a été calculée par rapport à plus de 6000 hématies et les parasites présentant une vacuolisation ont été dénombrés. La parasitémie initiale étant différente lors des deux manipulations, les parasitémies obtenues ont été rapportées à celle du contrôle DMSO de la condition normale (1 x PBS ou 0 % H₂O milliQ) afin de déterminer un index de valeur 1.

10 . Killing Rate

Le protocole a été adapté de la procédure décrite par Sanz *et al.*, 2012. Brièvement, la souche 7G8 à 2 % d'hématocrite et 0,5 % de parasitémie (correspondant à 10⁵ parasites/ml) contenant principalement la forme anneau (environ 80 %) a été incubée avec 10 fois la CI₅₀ de MR27770 (10 µM), de LPI3363 (2,5 µM), d'artémisinine (50 nM), de chloroquine (500 nM) ou d'atovaquone (5 nM) dans des flasques de 10 ml (F25). Le milieu contenant le composé à tester a été changé quotidiennement. Différentes conditions d'incubation ont été étudiées :

- 1 h, 3 h, et 6 h pour MR27770 et l'artémisinine,
- 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h et 120 h pour MR27770, LPI3363, l'artémisinine, la chloroquine et l'atovaquone.

A chaque point de récolte et pour le contrôle non traité à $t = 0$, un aliquote de 1 ml a été prélevé, centrifugé et lavé par 10 ml de RPMI. Une solution de 500 µl contenant 10 µl de culot de chaque condition a été réalisée (2 % d'hématocrite) et 150 µl de ces suspensions ont été répartis dans 2 puits d'une plaque 96 puits (colonne 1). Une suspension globulaire à 2 % d'hématocrite a été déposée dans les puits des colonnes 2 à 12 de la plaque 96 puits et une dilution clonale en cascade a été réalisée en transférant 50 µl du puits 1 jusqu'au puits 12 où les 50 µL restants ont été éliminés (dilution au 1/3). Après 3 jours d'incubation puis toutes les semaines, le milieu de culture est éliminé par aspiration et remplacé par 100 µl de milieu frais. Après une semaine d'incubation, 50 µl de surnageant sont éliminés et remplacés par une suspension globulaire à 2 % d'hématocrite, afin d'obtenir un hématocrite de 4 % plus favorable à la croissance du parasite. La semaine suivante, 50 µl de chaque puits remis en suspension sont éliminés et remplacés par une suspension globulaire à 4 % d'hématocrite. Trois semaines après la mise sous pression, la viabilité parasitaire est évaluée par réalisation du test ELISA pLDH selon le protocole B.2.iii. Le nombre de parasites viables correspond à X^{n-1} où X est le facteur de dilution (3 dans notre cas) et n correspond au nombre de puits où le parasite a poussé. La manipulation a été réalisée une fois en duplicata et est en cours de confirmation.

11 . Sélection de mutant résistant par pression continue

Adapté d'après le protocole du laboratoire de D. Fidock (Columbia University, NY) disponible en ligne (Lee, 2017). Brièvement, la souche W2-mef a été diluée de façon clonale pour obtenir

0,5 parasites/puits d'une plaque 96 puits à 2 % d'hématocrite, 100µl/puits. Le milieu a été changé tous les 2 à 3 jours et des hématies fraîches ont été ajoutées toutes les semaines. La viabilité a été déterminée après 3 semaines de culture selon le protocole ELISA pLDH du point B.2.iii. Les puits où une croissance parasitaire a été mise en évidence ($DO > 0,1$) ont été remis en culture dans 5 ml à 1 % d'hématocrite, dont le volume a été augmenté progressivement en fonction de la croissance. Les clones ont été congelés et le clone W2-D11 a été choisi pour la suite des manipulations car il était le premier à être opérationnel. L'ADN génomique du clone a été purifié à $t = 0$ (selon le protocole du fournisseur du kit QIAampDNA Mini and blood Mini, Qiagen) et 4 flasques contenant 1.10^8 parasites (4 % d'hématocrite, 2,5 % parasitémie dont essentiellement des anneaux, 10 ml) ont été mises en culture en parallèle, 3 traitées en continu par MR27770 à 7 µM (représentant 5 fois la CI_{50} vis-à-vis de ce clone) et une traitée en continu par la même concentration de DMSO que les 3 autres ($1/1000^{ème}$, contrôle). Le milieu a été changé quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience (60 jours de pression + 21 jours sans pression) et des globules rouges sains ont été ajoutés à J7 (0,4 % d'hématocrite). A partir de J14 puis toutes les semaines suivantes, $\frac{1}{4}$ du volume de la culture est éliminé et remplacé par une suspension globulaire à 4 % d'hématocrite. Des frottis quotidiens ont été réalisés pour s'assurer de la mort des parasites (l'annulation de la parasitémie a été observée à J6) puis régulièrement pour mettre en évidence une éventuelle recrudescence.

C . Voies métaboliques et mécanismes d'action investigués

1 . Inhibition de la digestion de l'hémoglobine

Protocole adapté d'après (Charris *et al.*, 2007) avec la souche 7G8.

i . Préparation des solutions nécessaires

- PBS-glucose 5,4 % : dissoudre 5,4 g de glucose dans 100 ml de PBS, conserver à +4°C
- Saponine 0,1 % : dissoudre 50 mg de saponine dans 50 ml de PBS, conserver à +4°C
- GSH 10 µM : dissoudre 3 mg de glutathion dans 10 ml de PBS, conserver à +4°C
- Tampon acétate 0,2 M, pH 5,4 : Dissoudre 2,72 g d'acétate de sodium trihydraté dans 100 ml d'eau milliQ. Ajuster le pH à 5,4 avec de l'acide acétique. Conserver à +4°C.

ii . Réalisation de l'extrait protéique parasitaire

A partir de 9 flasques de culture à 2 % d'hématocrite (9 ml de d'hématies parasitées à environ 10 %), récolter les trophozoïtes sur plasmagel (1 volume d'hématies parasitées, 1,5 volume de plasmagel et 2 volumes de milieu le tout laissé décanté pendant 30 min) et conserver le surnageant obtenu et lavé à +4°C jusqu'au lendemain. Les anneaux (culot) sont remis en culture et récoltés de la même manière le lendemain où ils auront évolué au stade trophozoïte. Pooler les parasites et les transférer dans des tubes eppendorf. Centrifuger deux minutes à 8500 rpm (centrifugeuse de paillasse minispin eppendorf) et rincer deux fois le culot avec la solution PBS-glucose 5,4 %. Retirer le surnageant et ajouter 15 x le

volume du culot de saponine à 0,1 % pour lyser les hématies. Laisser agir 10 min puis ajouter ensuite 1 ml de PBS et centrifuger à 13 000 g pendant 5 min à +4°C pour éliminer le contenu cytoplasmique du globule rouge (dont l'hémoglobine). Rincer une fois le culot avec la solution de PBS-glucose 5,4 %. Centrifuger et éliminer le surnageant et reprendre le culot dans environ 5 x son volume de PBS-glucose 5,4 %. Réaliser 4 cycles de congélation (-20°C) décongélation (bain marie, 37°C) pour lyser les parasites. L'homogénat final est utilisé pour le test d'inhibition de l'hydrolyse de l'hémoglobine.

iii . Préparation de l'hémoglobine native

Reprendre des hématies dans 2 fois leur volume d'eau milliQ. La solution qui en résulte est utilisée comme substrat (hémoglobine). Conserver à +4°C.

iv . Inhibition de l'hydrolyse de l'hémoglobine

Mélanger :

- La solution d'hémoglobine (10 µl)
- L'extrait parasitaire (50 µl, correspond à environ 50 µg de protéines)
- Le glutathion réduit à 10 µM (10 µl)
- Les produits à tester ou leur contrôle DMSO (10 µl)
- Le tampon acétate qsp 100 µl

Incuber pendant 18 heures à 37°C

Conditions :

1. Hémoglobine sans enzyme : pas d'extrait parasitaire
2. Enzyme sans hémoglobine : pas d'hémoglobine
3. Enzyme + hémoglobine : hémoglobine + extrait parasitaire
4. MR27770 100 µM : hémoglobine + extrait parasitaire + solution MR27770 x 10
5. MR27770 10 µM : hémoglobine + extrait parasitaire + solution MR27770 x 10
6. Artésunate 100 µM : hémoglobine + extrait parasitaire + solution artésunate x 10
7. Artésunate 10 µM : hémoglobine + extrait parasitaire + solution artésunate x 10

v . Migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Réaliser un dosage des protéines via un test de Bradford (réactif Biorad protein assay) en parallèle d'une gamme de BSA (8 points ; 0,1 à 1 mg/ml). Dans chaque puits (en triplicat) déposer 250 µl de la solution de Bradford diluée au 1/5^{ème} et 10 µl d'échantillon. Lire la DO à 590 nm. Déterminer la concentration à partir de l'équation de la droite d'étalonnage (les échantillons ont été dilués au 1/20^{ème} pour avoir une DO).

Les échantillons sont tous dilués dans le tampon de migration (contenant du β -mercaptoéthanol) de la même façon afin de déposer l'équivalent de 50 μ g de protéines de la condition 1 (hémoglobine sans enzymes parasitaires) et bouillis avant électrophorèse. Ils sont ensuite mis à migrer sur un gel SDS-PAGE à 15 % d'acrylamide à 110 V pendant environ 1h30. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie pendant 1 heure et décoloré pendant une nuit. Les bandes sont analysées visuellement par comparaison des bandes de globine migrant à 14,4 kDa.

2 . Inhibition de la lyse induite par le sorbitol

Le protocole a été adapté de la référence (Sisodia *et al.*, 2012). Brièvement, 500 μ l de globules rouges parasités par la souche 7G8 contenant environ 10 % de parasite au stade trophozoïte et/ou schizonte a été centrifugée puis lavée deux fois avec une solution NaCl (150 mM) - HEPES (20 mM) à pH 7,4. Les solutions des composés à tester (ainsi qu'un contrôle DMSO) sont diluées à 200 μ M dans un tampon sorbitol (300 mM) – HEPES (20 mM), pH 7,4. 100 μ l de la suspension parasitaire à 50 % d'hématocrite sont mélangés à 100 μ l de composés à 200 μ M et 800 μ l de tampon sorbitol-HEPES dans des tubes eppendorf et mis à incuber à 37°C pendant 30 min. Une suspension de globules rouges sains a été traitée en parallèle dans les mêmes conditions afin de tenir compte d'une hémolyse non spécifique dans ces conditions. Après 30 min d'incubation, les tubes sont centrifugés et 100 μ l de surnageant sont transférés dans une plaque 96 puits et leur densité optique est déterminée à 590 nm en triplicata pour estimer la quantité d'hémoglobine présente due à la lyse. Le furosémide a été utilisé en tant que contrôle positif et la chloroquine comme contrôle négatif. Le calcul suivant nous permet de déterminer le pourcentage d'inhibition de la lyse induite par le sorbitol et donc l'effet inhibiteur des canaux anioniques :

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \left(\frac{DO \text{ GRP}_{\text{composé}} - DO \text{ GRS}_{\text{composé}}}{DO \text{ GRP}_{\text{contrôle DMSO}} - DO \text{ GRS}_{\text{contrôle DMSO}}} \times 100 \right)$$

GRP = conditions globules rouges parasités (lyse spécifique), GRS = conditions globules rouges sains (lyse aspécifique).

3 . Evaluation de l'effet de MR27770 vis-à-vis de la voie du MEP (Collaboration A. Hemmerlin, IBMP)

Une suspension cellulaire de cellules de tabac BY-2 transformées L346 (BY-2 H₆-GFP-BD-CVIL) (Hartmann *et al.*, 2013) dans du milieu MS (*Murashige and Skoog*) est répartie dans une plaque 6 puits (3 ml/puits). Un puits contrôle DMSO et un puits contrôle traité à la fosmydomicine (100 μ M) sont réalisés en parallèle du puits traité par MR27770. Les cellules sont incubées pendant 3 heures dans ces conditions, à 27 °C, à l'abri de la lumière et sous agitation. La dexaméthasone (10 μ M) est ajoutée ensuite pour induire l'expression de la calmoduline marquée à la GFP et les cellules sont observées le lendemain par microscopie confocale. Le phénotype des cellules (fluorescence du noyau ou de la membrane plasmique) est comptabilisé sur environ 100 cellules.

D . Mesure de cytotoxicité sur cultures cellulaires

La mesure de la cytotoxicité sur des cultures cellulaires non tumorales permet de déterminer, pour chaque molécule testée, un indice de sélectivité (IS) qui est égal au rapport de la valeur de la CI_{50} de la cytotoxicité observée rapportée à celle de l'activité anti-*Plasmodium*. Plus la valeur de l'indice de sélectivité est importante, plus l'activité anti-*Plasmodium* est sélective. Dans les essais d'activité antiparasitaire sur les protozoaires, on estime classiquement qu'un $IS > 10$ est le signe que l'activité antipaludique observée n'est pas due à une toxicité cellulaire générale, donc aspécifique.

1 . Culture cellulaire de la lignée Hepa-1.6

Les cellules Hepa-1.6 sont une lignée de cellules cancéreuses d'hépatome de souris (Darlington, 1987). Elles sont cultivées dans du milieu de culture DMEM supplémenté d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline, 10 U/ml ; streptomycine, 10 μ g/ml ; Life Technologies) et de sérum fœtal de veau inactivé à hauteur de 10 %.

Les Hepa-1.6 sont des cellules adhérentes qui sont cultivées en flasques F75 et doivent être repiquées tous les deux jours. Pour cela le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées avec 5 ml de PBS (car le sérum inactive la trypsine). Les cellules sont décollées en ajoutant 5 ml de trypsine et en incubant environ 5 minutes. Deux fois 5 ml de milieu contenant du sérum sont ensuite ajoutés pour inactiver la trypsine et rincer la flasque. La suspension cellulaire est transférée dans un tube à centrifuger de 50 ml et sont mises à centrifuger à 281 g à 4 °C pendant 5 min. Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules sont reprises dans un volume X de milieu de culture. Une nouvelle flasque est préparée dans laquelle on ajoute 10 ml de milieu de culture et X/2 ml de suspension cellulaire (division de la culture au 1/2). Les cellules sont ensuite mises à incuber à 37°C sous 5 % de CO_2 . L'entretien de la culture est arrêté après environ 30 passages.

2 . Culture primaire de fibroblastes humains

Les cellules pNHDF (Primary Normal Human Dermal Fibroblasts) sont des cellules adhérentes non transformées. Elles sont cultivées dans un milieu de culture sans sérum (*Fibroblast growth medium, Promocell*) supplémenté en facteur de croissance (*Basic Fibroblast Growth Factor*, 1 ng/ml) et en insuline (5 μ g/ml). Elles ont une croissance plus lente que les Hepa1-6 et sont repiquées de la même façon dès qu'elles arrivent à confluence avec des réactifs adaptés :

- HepesBSS (30 mM Hepes) pour rincer les cellules à la place du PBS
- Trypsin / EDTA Solution (0,04 % / 0,03 %) pour décoller les cellules
- Trypsin Neutralizing Solution (TNS) pour neutraliser la trypsine car le milieu de culture ne contient pas de sérum.

La culture primaire peut être maintenue pendant environ 15 passages.

3 . Culture cellulaire de la lignée ThP1

Les cellules ThP1 sont une lignée transformée de cellules cancéreuses de leucémie monocyttaire (Tsuchiya *et al.*, 1982). Elles sont cultivées dans du milieu de culture RPMI-1640 supplémenté d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline, 10 U/ml ; streptomycine, 10 µg/ml ; Life Technologies) et de sérum fœtal de veau inactivé à hauteur de 10 %.

Les ThP1 sont des cellules en suspension qui sont cultivées en flasques F75 et doivent être repiquées tous les deux jours. Pour cela la suspension cellulaire est prélevée et transférée dans un tube à centrifuger de 50 ml et est centrifugée à 281 g à 4°C pendant 5 min. Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules sont reprises dans un volume X de milieu de culture. Une nouvelle flasque est préparée dans laquelle on ajoute 10 ml de milieu de culture et X/3 ml de suspension cellulaire (division de la culture au 1/3). Les cellules sont ensuite mises à incuber à 37°C sous 5 % de CO₂.

4 . Test de viabilité cellulaire au WST8

Pour évaluer la cytotoxicité des composés, les cellules sont récoltées de la même façon que pour l'entretien de la culture et comptées sur lame de Kova en présence de bleu Trypan. 5000 cellules par puits (Hepa-1.6 et ThP1) ou 500 cellules par puits (NHDF) sont réparties dans les puits d'une plaque 96 puits avec un volume final de 100 µl. Les plaques ainsi préparées sont ensuite mises à incuber à 37 °C sous 5 % de CO₂ jusqu'au lendemain afin de permettre leur adhésion au fond des puits.

Le lendemain, l'intégrité cellulaire dans chaque puits est vérifiée au microscope inversé. Les composés sont dilués dans du milieu de culture correspondant et 50 µl de chaque solution correspondant à 3 fois la concentration finale sont ajoutés dans chaque puits correspondant à la concentration souhaitée. La ligne H de chaque plaque sert de contrôle DMSO en ajoutant 50 µl de milieu contenant la même concentration de DMSO que les échantillons à tester (7 concentrations par composés de 100 à 0,138 µg/ml). Les plaques sont ensuite mises à incuber pendant 72 heures dans les mêmes conditions que précédemment.

Au bout de 72 heures, 10 µl du réactif (WST-8, (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt, dérivé non toxique du MTT ; Cell counting kit 8, Sigma-Aldrich) sont répartis dans chaque puits et les cellules sont mises à incuber pendant 3 à 4 heures supplémentaires à 37 °C sous 5 % de CO₂. Si les cellules sont vivantes, le sel de tétrazolium va être réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale en dérivé soluble du formazan, de couleur jaune. La lecture de l'absorbance à 450/590 nm nous permet donc d'évaluer le pourcentage de croissance (par rapport à la moyenne des DO des contrôles non traités = 100 % de croissance) et de déterminer la CI₅₀ des composés. Un blanc est réalisé en parallèle pour les composés colorés. Chaque expérimentation est réalisée en triplicat et renouvelée 1 fois (n = 2).

5. Test de viabilité à la résazurine

La cytotoxicité est testée sur la lignée L6 (myoblastes de muscle squelettique de rat) en collaboration avec le Dr M. Kaiser du *Swiss Tropical and Public Health Institute* de Bâle. La viabilité cellulaire est évaluée par le test à la résazurine en présence de concentrations croissantes des molécules à tester (10^{-9} M à 10^{-5} M, 6 concentrations) (Ahmed *et al.*, 1994). En culture, une croissance continue induit le maintien d'un environnement réducteur tandis qu'une inhibition de la croissance induit un environnement oxydant dans le milieu. Ainsi, la résazurine passe d'une forme oxydée (non fluorescente, colorée en bleu) à une forme réduite, la résorufine (fluorescente et colorée en rouge), dans un milieu de culture où il existe une activité cellulaire. La substance de référence utilisée ici est la podophyllotoxine. Chaque expérimentation est renouvelée 1 fois (n= 2).

E. Evaluation de la chimiosensibilité de *Babesia divergens*

B. divergens est cultivé de la même façon que *P. falciparum* excepté que le milieu de culture est composé de RPMI-1640 additionné d'HEPES 25 mM et de sérum de veau fœtal inactivé (SVFI) à hauteur de 10 % sur globules rouges humains O⁺ (2 % d'hématocrite).

Les tests sont réalisés de la même façon que pour *P. falciparum* en partant d'une parasitémie de 1 % (parties B.2.i et ii). La viabilité est mesurée par microscopie après 72 heures d'incubation avec les composés à tester. L'atovaquone est utilisée comme contrôle positif.

F. Evaluation de la chimiosensibilité de *Toxoplasma gondii*

La souche RH $\Delta ku80$ YFP-luc de *T. gondii* a été utilisée pour les tests de screening. Elle est cultivée sur cellules MRC-5 dans du milieu RPMI-1640 contenant 10 % de SVFI et un mélange d'antibiotiques (pénicilline, 10 U/ml ; streptomycine, 10 μ g/ml ; Life Technologies). Le protocole est adapté de la référence de Kamau *et al.* (Kamau *et al.*, 2011). La veille, une plaque 96 puits estensemencée avec 5000 cellules MRC-5/puits. Le lendemain, vérifier que les cellules soient adhérentes, récolter les toxoplasmes et ensemercer 20 000 toxoplasmes dans chaque puits (une colonne par composé n'étant pas contaminée par des toxoplasmes afin de mesurer la toxicité cellulaire). Poser la plaque sur glace pendant 15 min afin que les toxoplasmes sédimentent et permettre ainsi l'invasion des cellules de façon synchrone. Incuber ensuite à 37 °C, 5 % de CO₂ et laisser l'infection se produire pendant 24 heures. Le lendemain, le surnageant est retiré et les cellules sont rincées avec du PBS pour éliminer au maximum les toxoplasmes qui n'auraient pas envahi les cellules. Les composés à tester sont ajoutés et incubés pendant 72 heures avec les cellules infectées. La viabilité est évaluée par la réponse luciférase des puits : le surnageant est retiré et les puits sont lavés avec 50 μ l de PBS. 100 μ l/puits de tampon de lyse (*Glow lysis Buffer*, Proméga) sont ajoutés. 50 μ l de chaque puits sont transférés dans une plaque 96 puits opaque et mélangés à 20 μ l de réactif luciférase (Proméga). La plaque est ensuite recouverte d'aluminium et l'activité luciférase est lue au luminomètre.

G . Evaluation de l'activité antiplasmodiale *in vivo*

Les tests *in vivo* sont effectués selon le modèle de Peters (1999) pour les composés les plus prometteurs (activité *in vitro* sur *P. falciparum* < 1 μ M et indice de sélectivité > 10), et en tenant compte dans la mesure du possible de leur propriétés physico-chimiques et/ou de leur biodisponibilité *in vivo*.

Les tests sont réalisés sur des souris mâles Swiss d'environ 20 g infectées par le parasite *P. berghei* ANKA exprimant la GFP (Franke-Fayard *et al.*, 2004). Brièvement, la souche de *P. berghei* ANKA est décongelée et inoculée par voie intrapéritonéale à une souris Swiss mâle. La parasitémie est suivie de façon quotidienne par frottis réalisé à partir d'une goutte de sang prélevée au niveau de la queue. Quand la parasitémie atteint 10 %, la souris est sacrifiée et son sang est prélevé sur tube citraté par ponction cardiaque. Le sang est dilué dans du PBS de façon à obtenir 1.10^7 hématies parasitées par ml. 200 μ l de cette suspension parasitaire sont ensuite inoculés à chaque souris à l'étude (souris Swiss mâles d'environ 20 g) par voie i.p., soit 2.10^6 hématies parasitées.

Les traitements sont mis en suspension dans une solution à 1 % de CarboxyMéthylCellulose (CMC ; Carboxyméthylcellulose sodium salt, low viscosity, Sigma Aldrich) car ils sont peu solubles en solution aqueuse. La solution de CMC est préparée la veille et mise à hydrater pendant 24 heures à 4 °C. Elle est non stérile et non filtrable (un filtre de 0,22 μ m retient la CMC), une nouvelle solution est donc préparée chaque jour. Si le vortex n'est pas suffisant pour mettre les traitements en suspension dans la CMC, ces derniers sont soniqués le temps nécessaire pour obtenir une suspension homogène.

Les souris sont réparties en groupes de 5 individus par traitement. Les traitements sont administrés à une dose de 100 mg/kg dans 200 μ l de solution de CMC. Deux groupes contrôles de 5 individus sont également traités :

- Le groupe contrôle positif de croissance (souris traitées par 200 μ l de solution de CMC)
- Le groupe contrôle négatif de croissance (souris traitées par 25 mg/kg de chloroquine en suspension dans 200 μ l de CMC).

Les souris sont traitées 1 heure après l'inoculation du parasite (J0), par voie i.p., puis les 3 jours suivants à la même heure (J1, J2, J3) soit 4 jours au total. La parasitémie est évaluée à partir de J4 par prélèvement d'une goutte de sang au niveau de la queue de chaque souris et réalisation d'un frottis sanguin.

Bibliographie de la partie méthodologique

Ahmed, S.A., Gogal, R.M., and Walsh, J.E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* *170*, 211–224.

Berenbaum, M.C. (1978). A Method for Testing for Synergy with Any Number of Agents. *Journal of Infectious Diseases* *137*, 122–130.

Boyle, M.J., Wilson, D.W., Richards, J.S., Riglar, D.T., Tetteh, K.K.A., Conway, D.J., Ralph, S.A., Baum, J., and Beeson, J.G. (2010). Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 14378–14383.

Burkot, T.R., Williams, J.L., and Schneider, I. (1984). Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* clones grown *in vitro* from the same isolate. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *78*, 339–341.

Charris, J., Lobo, G., Camacho, J., Ferrer, R., Barazarte, A., Dominguez, J., Gamboa, N., Rodrigues, J., and Angel, J. (2007). Synthesis and Antimalarial Activity of (E) 2-(2-Chloro-3-Quinolinylmethylidene)-5,7-Dimethoxyindanones. *Letters in Drug Design & Discovery* *4*, 49–54.

Darlington, G.J. (1987). Liver cell lines. *Meth. Enzymol.* *151*, 19–38.

Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D., and Chulay, J.D. (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* *16*, 710–718.

Duru, V., Khim, N., Leang, R., Kim, S., Domergue, A., Kloeung, N., Ke, S., Chy, S., Eam, R., Khean, C., *et al.* (2015). *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperaquine *in vitro* assays: retrospective and prospective investigations. *BMC Medicine* *13*.

Fivelman, Q.L., Adagu, I.S., and Warhurst, D.C. (2004). Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 4097–4102.

Franke-Fayard, B., Trueman, H., Ramesar, J., Mendoza, J., van der Keur, M., van der Linden, R., Sinden, R.E., Waters, A.P., and Janse, C.J. (2004). A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* *137*, 23–33.

Hartmann, M., Hemmerlin, A., Gas-Pascual, E., Gerber, E., Tritsch, D., Rohmer, M., and Bach, T.J. (2013). The effect of MEP pathway and other inhibitors on the intracellular localization of a plasma membrane-targeted, isoprenylable GFP reporter protein in tobacco BY-2 cells. *F1000Res* *2*, 170.

Kamau, E., Meehan, T., Lavine, M.D., Arrizabalaga, G., Mustata Wilson, G., and Boyle, J. (2011). A Novel Benzodioxole-Containing Inhibitor of *Toxoplasma gondii* Growth Alters the Parasite Cell Cycle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *55*, 5438–5451.

Lee, M. (2017). Selection (Marcus Lee).pdf - Google Drive.
url : < <https://drive.google.com/file/d/0BweP0W0coae-QjJqWHBSU0htYVvk/view>>

Rivadeneira, E.M., Wasserman, M., and Espinal, C.T. (1983). Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. *J. Protozool.* *30*, 367–370.

Sanz, L.M., Crespo, B., De-Cózar, C., Ding, X.C., Llergo, J.L., Burrows, J.N., García-Bustos, J.F., and Gamo, F.-J. (2012). *P. falciparum* *In Vitro* Killing Rates Allow to Discriminate between Different Antimalarial Mode-of-Action. *PLoS ONE* 7, e30949.

Sisodia, B.S., Negi, A.S., Darokar, M.P., Dwivedi, U.N., and Khanuja, S.P.S. (2012). Antiplasmodial activity of steroidal chalcones: evaluation of their effect on hemozoin synthesis and the new permeation pathway of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte membrane: Antiplasmodial activity of steroidal chalcones. *Chemical Biology & Drug Design* 79, 610–615.

Thaithong, S., and Beale, G.H. (1981). Resistance of ten Thai isolates of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and pyrimethamine by in vitro tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 271–273.

Toyama, T., Tahara, M., Nagamune, K., Arimitsu, K., Hamashima, Y., Palacpac, N.M.Q., Kawaide, H., Horii, T., and Tanabe, K. (2012). Gibberellin biosynthetic inhibitors make human malaria parasite *Plasmodium falciparum* cells swell and rupture to death. *PLoS ONE* 7, e32246.

Trager, W., and Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673–675.

Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., and Tada, K. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 42, 1530–1536.

Wein, S., Maynadier, M., Tran Van Ba, C., Cerdan, R., Peyrottes, S., Fraisse, L., and Vial, H. (2010). Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1651–1660.

Witkowski, B., Amaratunga, C., Khim, N., Sreng, S., Chim, P., Kim, S., Lim, P., Mao, S., Sopha, C., Sam, B., et al. (2013). Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *The Lancet Infectious Diseases* 13, 1043–1049.

(1999). *Handbook of animal models of infection: experimental models in antimicrobial chemotherapy* (San Diego: Academic Press).

Annexe

Liste des publications et des communications scientifiques

Relatives au projet – en collaboration – dans le cadre de ma première année d'internat

BREVET

Novel substituted flavones as antimalarial agents

Nardella F, Stiebing S, Schmitt M, Collot V, Vonthron-Sénécheau C.

En cours de rédaction (Cabinet Becker, Paris)

CHAPITRE D'OUVRAGE

Antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavonoids.

Nardella F, Gallé JB, Weniger B, Bourjot M, Vonthron-Sénécheau C

Natural Antimicrobial Agents, editors : Mérillon JM and Rivière C

Springer, à paraître.

LISTE DES PUBLICATIONS

- P1.** Flavone derivatives: fast-acting compounds with sustained activity against artemisinin-resistant *falciparum* malaria parasites.
Nardella F, Stiebing S, Wagner P, Schmitt M, Collot V, Ménard D, Witkowski B, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
Antimicrobial Agents Chemotherapy (2017), en préparation
- P2.** Flavone derivatives: a new class of drug active against multi-resistant *falciparum* malaria parasites.
Nardella F, Stiebing S, Wagner P, Schmitt M, Candolfi E, Collot V, Vonthron-Sénécheau C
J Med Chem (2017), en préparation
- P3.** Antiplasmodial activities of naturally occurring flavonoids and their derivatives.
Nardella F, E. Candolfi, Vonthron-Sénécheau C
Nat Prod Rep (2017), en préparation
- P4.** Ceanothane-type triterpenoids from *Cyphostemma adenocaula*
Chouna JR, Tamokou JD, **Nardella F**, Vonthron-Sénécheau C, Lenta BN, Nkeng-Efouet-Alango P, Sewald N
Archives of Pharmacal Research 2016 Jul [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s12272-016-0801-1.
- P5.** Wayanin and guaijaverin, two active metabolites found in a *Psidium acutangulum* Mart. ex DC (syn. *P. persoonii* McVaugh) (Myrtaceae) antimalarial decoction from the Wayana Amerindians.
Houël E, **Nardella F**, Jullian V, Valentin A, Vonthron-Sénécheau C, Villa P, Obrecht A, Kaiser M, Bourreau E, Odonne G, Fleury M, Bourdy G, Eparvier V, Deharo E, Stien D
Journal of Ethnopharmacology 2016 Jul 1;187:241-8.

- P6.** A UV-Raman spectrometry method for quality control of anticancer preparations: Results after 18 months of implementation in hospital pharmacy.
Nardella F, Beck M, Collart-Dutilleul P, Becker G, Boulanger C, Perello L, Gairard-Dory A, Gourieux B, Ubeaud-Séquier G
International Journal of Pharmaceutics 2016 Feb 29;499(1-2):343-50.
- P7.** Two 2,6-Dioxabicyclo[3.3.1]nonan-3-ones from *Phragmanthera capitata* (Spreng.) Balle (Loranthaceae).
 Lenta NB, Ateba T, Chouna JR, Aminake MN, **Nardella F**, Pradel G, Neumann B, Stammler HG, Vonthron-Senecheau C, Ngouela S, Sewald N
Helvetica Chimica Acta 2015 July 98;7:945-52
- P8.** Antiplasmodial and anti-inflammatory effects of an antimalarial remedy from the Wayana Amerindians, French Guiana: *Takamalaimë* (*Psidium acutangulum* mart. ex DC., Myrtaceae).
 Houël E, Fleury M, Odonne G, **Nardella F**, Bourdy G, Vonthron-Sénécheau C, Villa P, Obrecht A, Eparvier V, Deharo E, Stien D
Journal of Ethnopharmacology 2015 May 26;166:279-85.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications avec actes publiés (5)

- C1.** Flavone derivatives: a promising tool in the fight against malaria (Poster)
Nardella F, Stiebing S, Wagner P, Collot V, Kaiser M, Witkowski B, Menard D, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
Planta Medica 2016, 81(S 01):S1-S381
 9th Joint Natural Products Conference, July 23-27, 2016, Copenhagen, Denmark
- C2.** Development of a pharmacophoric deconvolution method for the targeted discovery of bioactive natural products (Poster)
 Bourjot M, Margueritte L, Markov P, **Nardella F**, Gallé JB, Schaeffer B, Viéville J, Bret G, Delsuc MA, Rognan D, Vonthron-Sénécheau C.
Planta Medica 2016, 81(S 01):S1-S381.
 9th Joint Natural Products Conference, July 23-27, 2016, Copenhagen, Denmark
- C3.** Substituted flavones: a promising scaffold in the fight against malaria (Poster)
Nardella F, Collot V, Stiebing S, Kaiser M, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
Malaria Journal 2014, 13(Suppl 1), P64
 Challenges in Malaria Research: Core science and innovation, September 22-24, 2014, Oxford, UK
- C4.** Takamalaimé (*Psidium acutangulum* ex. DC): understanding the use of an antimalarial traditional remedy from French Guiana (Poster)
 Houël E, Fleury M, Jullian V, Vonthron-Sénécheau C, **Nardella F**, Villa P, Odonne G, Eparvier V, Deharo E, Stien D
Planta Medica 2014, 80, 797-797
 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA,) August 31-September 4, 2014, Guimaraes, Portugal
- C5.** Synthetic flavone derivatives as potential new in vivo antimalarial agents (Poster)
Nardella F, Collot V, Weniger B, Kaiser M, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
Planta Medica 2013, 79, PA26

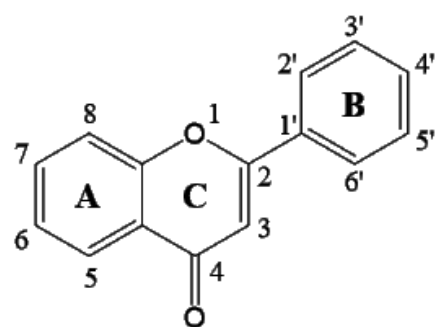
61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), September 1-5, 2013, Münster, Germany

Communications sans actes publiés (13)

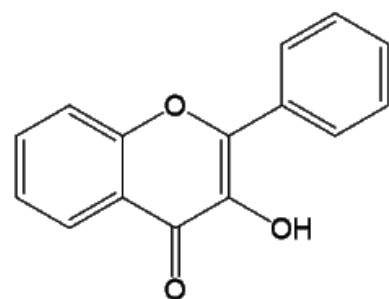
- C6.** Flavone derivatives: a promising new class of drug active against multi-resistant falciparum malaria parasites (Communication orale)
Nardella F, Stiebing S, Wagner P, Collot V, Kaiser M, Witkowski B, Menard D, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
 Séminaires de Microbiologie de Strasbourg 2017, Forum de la faculté de Médecine, March 1st, 2017, Strasbourg, France
Prix de la 2^{ème} meilleure communication orale
- C7.** Flavone derivatives: a promising new class of drug active against multi-resistant falciparum malaria parasites (Communication orale)
Nardella F, Stiebing S, Wagner P, Collot V, Kaiser M, Witkowski B, Menard D, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
 Medalis public scientific meeting 2016 “Drug development in an academic environment”, Colleege Doctoral Européen, December 6, 2016, Strasbourg, France
- C8.** Flavone derivatives: a promising new class of drugs active against multi-resistant falciparum malaria parasites (Poster)
Nardella F, Stiebing S, Wagner P, Collot V, Kaiser M, Witkowski B, Menard D, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
 ASTMH 65th Annual Meeting, November 13-17, 2016, Atlanta, Georgia USA
- C9.** *Takamalaimë, Wayana malaleja epit* : une perspective holistique pour l'étude de *Psidium acutangulum* Mart. Ex DC., (Myrtaceae), un remède antipaludique des Amérindiens wayana de Guyane (Communication orale)
Houël E, **Nardella F**, Fleury M, Jullian V, Valentin A, Vonthron-Sénécheau C, Villa P, Obrecht A, Kaiser M, Bourreau E, Odonne G, Eparvier V, Bourdy G, Deharo E, Stien D
 Colloque International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales (CIPAM), November 7-12, 2016, Cayenne, Guyane, France
- C10.** Substituted flavones: a promising scaffold in the fight against malaria (Poster)
Nardella F, Collot V, Stiebing Silvia, Kaiser M, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
 Pasteur Network Meeting 2015 Conference, October 14-16, 2015, Paris, France
- C11.** Development of a pharmacophoric deconvolution method: the proof of concept (Poster)
Bourjot M, **Nardella F**, Gallé JB, Viéville J, Schaeffer B, Vonthron-Sénécheau C
 2ème Symposium International AFERP-STOLON, July 15-17, 2015, Lyon, France
- C12.** New antimalarial flavones: from screening to in vivo proof of concept (Poster)
Nardella F, Collot V, Stiebing Silvia, Kaiser M, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
 2ème Symposium International AFERP-STOLON, July 15-17, 2015, Lyon, France
- C13.** New antimalarial flavones: from screening to in vivo proof of concept (Communication orale)
Nardella F, Collot V, Stiebing Silvia, Kaiser M, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
 Journées Campus d'Illkirch 2015, April 13-14, 2015, Illkirch, France

- C14.** MR70: a drug candidate to treat malaria (Communication orale)
Nardella F, Collot V, Stiebing Silvia, Kaiser M, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
Medalis public scientific meeting 2014 “Drug development in an academic environment”,
College Doctoral Européen, December 9, 2014, Strasbourg, France
- C15.** A call for a new approach against a neglected parasitic disease: the AmazInG project, a holistic view on traditional Amazonian antileishmanial remedy (Communication orale)
Odonne G, Bourreau E, Vonthron C, **Nardella F**, Eparvier V, Makerri C, Jahn-Oyac A, Deharo E, Bourdy G, Stien D, Houël E
14th International Congress of the Society of Ethnopharmacology, September 23-26, 2014,
Puerto Varas, Chile
- C16.** Substituted flavones, a new antimalarial chemotype (Poster)
Nardella F, Collot V, Stiebing S, Schmitt M, Kaiser M, Weniger B, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
17th International Phytopharma Congress, July 8-10, 2013, Vienna, Austria
- C17.** Nouvelles flavones antipaludiques d’origine naturelle : du criblage à la preuve de concept in vivo (Poster)
Nardella F, Collot V, Kaiser M, Stiebing S, Schmitt M, Weniger B, Candolfi E, Perrotey S, Vonthron-Sénécheau C
Symposium international de l’AFERP, May 22-24, 2013, Bruxelles, Belgium
- C18.** Nouvelles flavones antipaludiques d’origine naturelle : du criblage à la preuve de concept in vivo (Communication orale)
Nardella F, Collot V, Stiebing Silvia, Kaiser M, Schmitt M, Candolfi E, Vonthron-Sénécheau C
3èmes Journées du Consortium anti-Parasitaire - CaP 2013, February 7, 2013, Lille, France

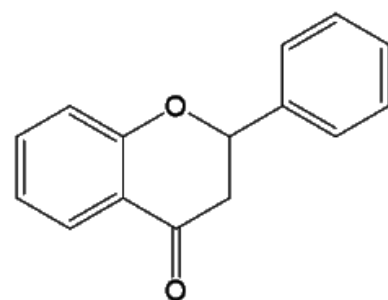
Structure chimique des flavonoïdes



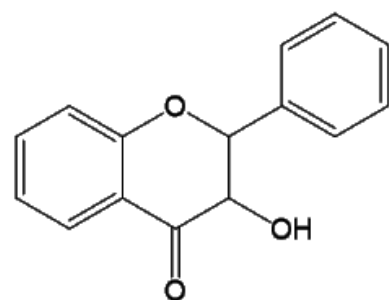
Flavone



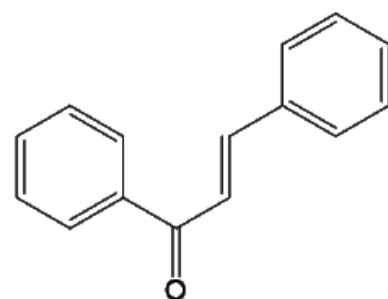
Flavonol



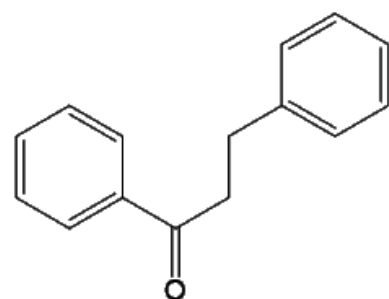
Flavanone



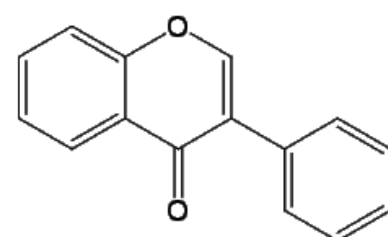
Dihydroflavonol



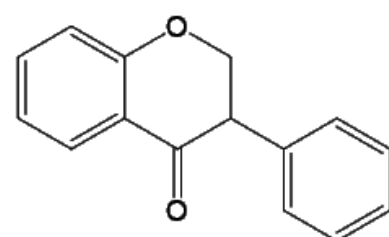
Chalcone



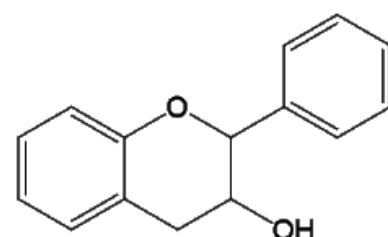
Dihydrochalcone



Isoflavone



Isoflavanone



Flavan-3-ol

Flore NARDELLA

Flavones substituées : une nouvelle classe de composés pour le traitement du paludisme

Optimisation vers un candidat médicament



EDSC
École Doctorale des
Sciences Chimiques

Résumé

Le paludisme est responsable de plus de 438 000 morts en 2015. L'apparition et la propagation de *P. falciparum* résistants à l'artémisinine, l'antipaludique le plus puissant, est un problème majeur en Asie du Sud-Est. Un besoin impérieux de nouveaux médicaments présentant une action rapide et conservée vis-à-vis de ces parasites résistants se fait sentir pour remplacer l'artémisinine. Cette thèse porte sur le développement d'une nouvelle série chimique inspirée d'un biflavonoïde naturel, la lanaroflavone. Le composé tête-de-série MR27770 présente des propriétés intéressantes : il agit de façon plus rapide que l'artémisinine tout au long du cycle érythrocytaire du parasite, ses propriétés pharmacocinétiques sont prometteuses et il est partiellement actif chez la souris impaludée. De plus, il ne présente pas de résistances croisées avec l'artémisinine ou les autres antipaludiques. Son mécanisme d'action n'est pas connu mais pourrait impliquer un stress osmotique. Ce composé prometteur présente néanmoins une activité moyenne *in vitro* ce qui a motivé l'étude topologique de sa structure et mené à des dérivés optimisés.

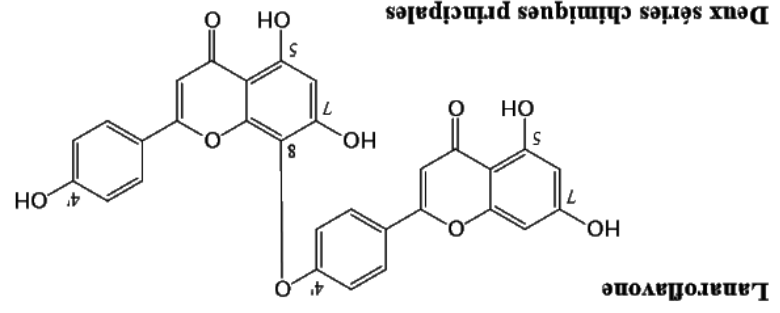
Mots-clés : Paludisme, *Plasmodium*, médicament, antipaludique, flavone

Abstract

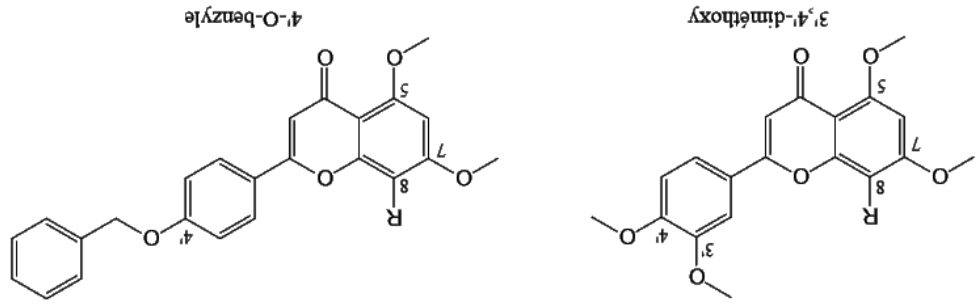
Malaria was responsible for 438.000 deaths in 2015. The increasing proportion of *P. falciparum* parasites resistant to artemisinin, the most potent antimalarial, is a major concern in Southeast Asia. Fast acting drugs with unaltered activity versus the current multi-drug resistant strains are urgently needed to replace artemisinin. This thesis deals with a new antimalarial series based on the structure of an active natural biflavonoid called lanaroflavone. The lead compound, MR27770, displays interesting properties: it acts throughout the blood cycle faster than artemisinin, its pharmacokinetic properties are promising, and it exhibits a partial *in vivo* antimalarial activity. Plus, it has no cross-resistance with artemisinin or other antimalarials. Its mode of action is unknown and could imply an osmotic stress. This promising compound has however a mild *in vitro* activity which motivated the topological study of its structure and led to optimized derivatives.

Keywords: Malaria, *Plasmodium*, drug, antimalarial, flavone

Structure de la lanaroflavone et de ses dérivés synthétiques



Deux séries chimiques principales



Composé tête-de-série et ses dérivés

