

Université de Lille 2
Année Universitaire 2015/2016

Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 01 juillet 2016

Par Madame Cécilia N'Guessan

**Evaluation de la chimio sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à des
composés à visée antipaludique.**

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur El Moukhtar ALIOUAT, Laboratoire de Parasitologie

Assesseur(s) : Madame le Professeur Rebecca DEPREZ, Laboratoire de Chimie Générale

Membre(s) extérieur(s) : Madame Florence LEROUX, Docteur, Unité INSERM U1177,
Institut Pasteur de Lille



**Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille**



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPREZ Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie Clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie Clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie Clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie Thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie

Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et économie Pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et économie Pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie Organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie Cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie Industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie Cellulaire (80%)

Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie Cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacologie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie Thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie Pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie

M.	WILLEMAGNE	Baptiste	Chimie Organique
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie Pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques

M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	CUCCHI	Malgorzata	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et économie Pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

***Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises
dans les thèses; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

Sommaire

Remerciements	11
Liste des sigles et des abréviations	12
Liste des figures.....	14
Liste des tableaux.....	14
Introduction	15
I- Généralités sur le Paludisme	18
1.1 Vecteur	18
1.2 L'agent pathogène: <i>Plasmodium</i>	20
1.3 Cycle de transmission de <i>Plasmodium falciparum</i>	21
1.3.1 Le cycle exo-érythrocytaire.....	21
1.3.2 Le cycle érythrocytaire.....	21
1.3.3 Cycle chez l'anophèle femelle.....	23
1.4 Clinique et physiopathologie.....	25
1.5 Diagnostic.....	26
1.5.1 L'observation au microscope	26
1.5.2 Test de diagnostic rapide.....	27
1.6 Vaincre le paludisme	28
1.7 Résistance aux médicaments antipaludiques.....	30
1.8 Portefeuille antipaludique 2016 et description des deux familles de composés.....	33
1.8.1 Portefeuille antipaludique 2016.....	33
1.8.2 Les métabolites dérivés du macrolide myxobactérien Chlorotonil A	36
1.8.3 Les métabolites dérivés du motif tropone et isolés de la souche <i>Penicillium</i> sp FKI-4410 .	38
II- Matériels et Méthodes	39
2.1 Maintenances des cultures.....	39
2.1.1 Culture parasitaire	39
2.1.2 Culture cellulaire	43
2.2 Test de la chimio sensibilité	50

2.2.1 Matériels pour tester la chimiosensibilité des composés contre les stades sanguins asexués de <i>P. falciparum</i>	50
2.2.2 Méthode pour tester la chimiosensibilité.....	51
2.3 Test de la cytotoxicité.....	58
2.3.1 Matériels pour tester la cytotoxicité	58
2.3.2 Méthode pour tester la cytotoxicité	60
2.4 Analyse des données	66
III- Résultats et discussion	67
3.1 Résultats et discussion autour de la chimio sensibilité.....	67
3.1.1 Description et sélection des contrôles	67
3.1.2 Résultats et Discussion.	68
3.2 Résultats et discussion autour de la cytotoxicité	72
3.2.1 Sélection des contrôles	72
3.2.2 Résultats et discussion.....	72
Conclusion	74
Références	75

Remerciements

Dans le cadre de la 6ème année de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lille II, filière Industrie-Recherche, et dans le cadre de mon Master 2 « Conception, Synthèse Evaluation et Sélection des principes actifs », nous avons à effectuer un stage d'une durée de 5 mois dans le secteur de la R&D. Ce stage sur la thématique du paludisme s'est déroulé de Février à Juin 2016 ; grâce à une collaboration avec l'Institut Tropical de Médecine de l'Université de Tübingen, en Allemagne.

J'ai une profonde gratitude pour les personnes qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à rendre cette étude possible, grâce à leur aide et leur soutien inestimables :

- L'équipe professorale de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'université de Lille II, filière Industrie- Recherche et l'équipe professorale du Master 2 Design Synthèse Evaluation et Sélection des principes actifs.
- Le Professeur Peter G. Kremsner, Directeur général de l'Institut tropical de Médecine pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage au sein de son institution.
- Le Docteur Benjamin Mordmüller, Directeur adjoint pour m'avoir permis de rejoindre son équipe.
- Le Docteur Jana Held, ma maitre de stage pour son suivi et ses conseils.
- Et toute l'équipe du laboratoire (techniciens, doctorants et stagiaires), en particulier Carlos Lamsfus Calle et Erik Koehne pour leurs soutiens tout au long de mon stage.

Liste des sigles et des abréviations

CC₅₀ Concentration cytotoxique 50

CE₅₀ Concentration efficace médiane

CI50 Concentration inhibant 50% de la croissance parasitaire

CMF PBS Calcium Magnesium Free Phosphate Buffered Saline

CTA Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine

DMSO Dimethylsulfoxyde

DO Densité optique

ELISA Enzyme linked immunosorbent assay

HRP Protéine riche en histidine

MII Moustiquaires imprégnées d'insecticides

MMV *Medicines for Malaria Venture*

NFS Numération de formule sanguine

***pf*CRT** plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter

***pf*GLOI** plasmodium falciparum Glyoxalase I

PID Pulvérisation intradomiciliaire

pLDH parasite Lactate Dehydrogenase

PM Poids Moléculaire

RBM Roll Back Malaria

SAB Sérum Albumine Bovine

SEC Single Exposure Chemoprotection

SERCap Single exposure radical cure and prophylaxis

TB Trypan Blue

TCP Target Candidate Profile

TDR Test de diagnostic rapide

TE Trypsin EDTA

TPP Target Product Profile

OMS Organisation Mondiale de la Santé

yGLOI yeast Glyoxalase I

Liste des figures

FIGURE 1 Caractéristiques morphologiques de l'Anophèle femelle	19
FIGURE 2 Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i>	24
FIGURE 3 Structure chimique du composé Chlororonil A	36
FIGURE 4 Structures chimiques de l'acide pubérulique et des dérivés de tropones	38

Liste des tableaux

Tableau 1 Antimalarial pipeline 2016	33
TABLEAU 2 Sélection des contrôles chloroquine et moyenne de leurs CI50.....	68
TABLEAU 3 Concentrations inhibitrices 50 des composés testés contre les souches 3D7 et Dd2 de <i>P.falciparum</i>	69
TABLEAU 4 Résultats de la cytotoxicité des composés actifs testés.....	72

Introduction

Le paludisme, (du latin= *palus*) ou malaria (de l'italien *mal 'aria* = mauvais air) est une maladie parasitaire causée par un hématozoaire unicellulaire du genre *Plasmodium*. Cette pathologie se transmet par la piquûre de moustiques femelles appartenant au genre *Anopheles* (1).

A travers le monde, 3,2 milliards de personnes sont exposées chaque jour au paludisme, bien que les efforts accrus de ces dernières années aient considérablement réduits les tendances de la prévalence de l'infection, de l'incidence des cas et du taux de mortalité dans de nombreuses régions du monde. Le nombre de décès imputable au paludisme a globalement diminué de 839 000 en 2000 à 438 000 en 2015. Les enfants âgés de moins de 5 ans constituent le groupe le plus à risque. Dans ce groupe, le nombre de décès imputable au paludisme a été réduit de moitié depuis 15 ans, pour atteindre approximativement 306 000 décès en 2015 (2).

Le paludisme demeure un problème majeur de santé publique, en particulier dans 95 pays où la transmission est toujours active. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), le paludisme a été éradiqué en Amérique du Nord, en Europe et en Australie (3).

Ce fléau qui tue un peu plus chaque jour est prédominant dans 15 pays d'Afrique Subsaharienne. Une région qui concentre à elle seule 80% des décès estimés dus au paludisme (2).

Roll Back Malaria (RBM) en collaboration avec l'OMS travaillent main dans la main pour un monde sans paludisme. L'année 2016 signe le début d'une nouvelle ère dans la lutte contre cette maladie.

D'une part, l'OMS a établi son nouveau plan d'action intitulé *Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030* et d'autre part le RBM a mis en place sa nouvelle stratégie: *Action and investment to defeat malaria 2016-2030*, dans le but de réduire la propagation du paludisme (4) (5). Ces plans d'action sont très ambitieux, incluant une diminution de l'incidence globale et de la mortalité due au paludisme d'au moins 90% d'ici 2030, en comparaison avec les chiffres de 2015. La première composante de la stratégie du RBM est d'assurer un accès universel à la prévention, au diagnostic et au traitement du paludisme (5).

P. falciparum est devenu résistant à presque tous les médicaments qui ont été utilisés en clinique sur le long terme. Pour faire face à la capacité de développer des résistances du parasite, il est nécessaire de développer continuellement de nouvelles molécules possédant idéalement des modes d'action différents pour remplacer les médicaments lorsqu'ils ne sont plus efficaces.

De nos jours, en matière de découverte de médicaments, il y existe deux approches pour identifier de nouvelles molécules : la conception rationnelle et le criblage de bibliothèques de composés. Le criblage de composés naturels est une bonne option, pour trouver de nouveaux médicaments contre les maladies infectieuses (6). Ceci pourrait être expliqué par la longue interaction durable des organismes coévoluant (7).

Cette étude (criblage à moyen débit) s'inscrit dans les premiers stades de développement d'un nouveau médicament. Le but d'une approche de criblage est de rapidement tester plusieurs molécules dans l'intention d'identifier des molécules actives avec les propriétés désirées. Dans le cas présent, nous nous sommes intéressés à l'inhibition de croissance du parasite *P. falciparum*.

À l'issue de ce criblage, un point de départ chimique est obtenu et est appelé « Hit ». Un « Hit » est donc une molécule qui a démontré une activité répétable et dose dépendante dans les essais biologiques. L'identité et la pureté ont été établies. Un hit est ensuite optimisé en un "lead" ou tête de série, en améliorant notamment les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques. Un lead est synthétisable, stable, proche de la forme finale et actif avec une spécificité et une sélectivité acceptables pour sa cible. Il a démontré un début de relation structure activité. Enfin un lead est optimisé en candidat médicament, prêt pour les études précliniques et enfin cliniques (8).

Dans un contexte où l'on cherche à définir des critères précis pour les « Hits » et les « Leads » et la nécessité de concevoir une nouvelle génération d'antipaludiques plus puissants avec moins d'effets secondaires, les caractéristiques optimales requises pour un composé antipaludique de nos jours, devraient être considérées.

L'objectif principal de cette étude est d'identifier des composés avec une activité antipaludique.

Cela est réalisé par la détermination l'activité *in vitro* de plusieurs composés testés *in vitro* contre les stades sanguins asexués de *Plasmodium falciparum* à l'aide d'un essai d'inhibition de croissance.

Après avoir établi l'activité, le deuxième objectif est d'évaluer la toxicité contre les cellules humaines en estimant la cytotoxicité des composés contre la lignée cellulaire HeLa.

Cette étude sera illustrée par deux familles de candidats médicaments. Une famille est constituée de métabolites myxobactériens et l'autre est constituée de métabolites fongiques. Nous insisterons particulièrement sur *Plasmodium falciparum* qui est l'espèce qui a été utilisée pour notre expérience de criblage de nouveaux composés.

Pour atteindre ces différents objectifs, après cette introduction nous nous efforcerons de décrire le contexte général et actuel du paludisme. Dans une seconde partie, nous mentionnerons le matériel et les méthodes utilisées dans cette étude. Dans une troisième partie nous présenterons les résultats qui seront discutés. En conclusion, dans le cadre d'une lutte antipaludique efficace, nous mettrons en valeur les perspectives en matière de recherche de nouveaux antipaludiques.

I- Généralités sur le Paludisme

1.1 Vecteur

Les anophèles femelles sont les moustiques vecteurs du paludisme et hôtes définitifs de *Plasmodium* (**Figure 1**). Ce vecteur a été décrit comme un genre de moustique en 1818 par Johann Wilhelm Meigen. Il a été identifié comme vecteur par Grassi en 1898. Le genre *Anopheles* appartient au règne Animal, embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, ordre des Diptères, sous ordre des *Nematocera*, famille des *Culicidae* et sous famille des *Anophelinae* (9).

A ce jour, plus de 400 espèces d'*Anopheles* ont pu être identifiées mais seulement une soixantaine est vectrice du paludisme à l'homme. L'espèce la plus répandue étant *Anopheles gambiae* sur le continent africain, où elle cohabite avec *A. funestus* et *A. arabiensis* (9). La majorité des espèces chasse la nuit, et sont plus agressives entre 20h et 3h du matin. On note que l'humidité augmente leur activité, alors que la climatisation a tendance à la diminuer. Ce sont des moustiques au vol silencieux, qui se repèrent notamment grâce aux couleurs sombres et à la lumière vive, aux mouvements, au CO₂, à la chaleur, à l'odeur et à la sueur (10).

Les femelles du genre *Anopheles* se nourrissent de liquide et de sang de vertébrés, la salive qu'elles injectent provoque parfois une réaction dermique. Ce repas sanguin est nécessaire à la maturation des œufs. Après la ponte, en général en eaux stagnantes, les œufs se transforment en larves aquatiques puis en moustique adultes.

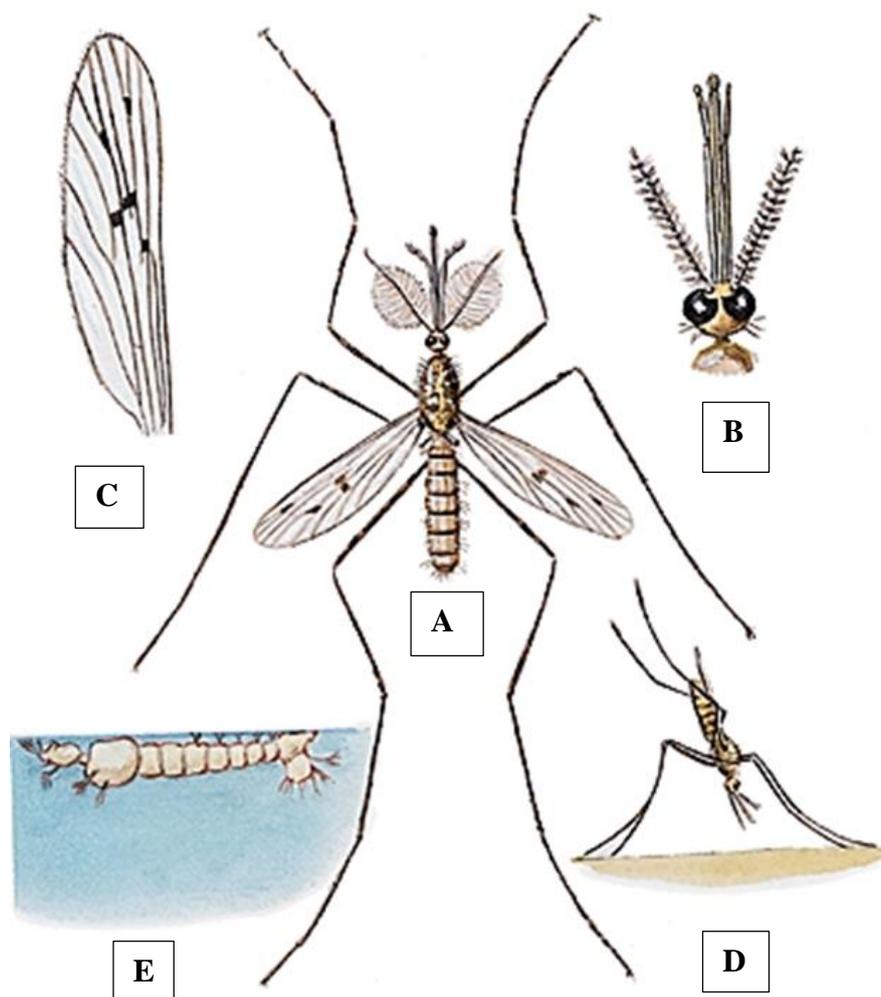


FIGURE 1 *Caractéristiques morphologiques de l'Anophèle femelle*

(Source: Archives Larousse, Michel Janvier)

Légende: A. Anophèle mâle; B. Appareil piqueur-suceur femelle; C. détail de l'aile ; D. adulte au repos ; E. position de la larve respirant dans l'eau.

1.2 L'agent pathogène: *Plasmodium*

Le terme *Plasmodium* se réfère au mot plasmode, une cellule géante multi nucléée qui formera autant de nouvelles entités, qu'elle possède de noyaux.

Il existe 5 espèces de *Plasmodium* impliquées en pathologie humaine et responsables de fièvres intermittentes : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* (11).

Les deux espèces les plus répandues sont, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*. *Plasmodium falciparum* est l'espèce au cœur de toutes les préoccupations. En effet elle est prédominante en Afrique et largement distribuée dans les régions tropicales et subtropicales. La morbi-mortalité liée au paludisme est essentiellement causée par *P. falciparum*, qui est notamment responsable des cas les plus sévères (12).

Plasmodium vivax est l'espèce la plus répandue. Cette espèce est principalement retrouvée en Asie, en Amérique latine et dans certaines régions de l'Afrique de l'Est. *Plasmodium vivax* (ainsi que *Plasmodium ovale*) possèdent des stades de dormance appelés hypnozoïtes qui peuvent être réactivés et provoquer des rechutes plusieurs mois voire plusieurs années plus tard (13).

Plasmodium knowlesi est une espèce relativement nouvelle, connue comme étant responsable de nombreux cas de paludisme zoonotiques en Asie du Sud-Est.

A cela, on peut ajouter d'autres espèces infectant le singe et pouvant occasionnellement infecter l'homme, à l'instar de *Plasmodium cynomolgi* (14).

Dans le cadre de notre expérience de criblage de nouveaux composés, nous avons utilisé *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium falciparum* appartient à l'embranchement des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoea*, à l'ordre des *Haemosporidiorida*, à la famille des *Plasmodiidae*, et au genre *Plasmodium*(15).

1.3 Cycle de transmission de *Plasmodium falciparum*

Le parasite est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle infecté du genre *Anopheles* (1).

Chez l'homme, il existe deux cycles : le cycle exo-érythrocytaire (dans le foie) et le cycle érythrocytaire (à l'intérieur des hématies)(13).

1.3.1 Le cycle exo-érythrocytaire

Lors d'un repas sanguin, l'*Anophèle* femelle infectée injecte au niveau d'un capillaire sanguin, les sporozoïtes se trouvant dans ses glandes salivaires. Durant les trente minutes suivant l'injection, les sporozoïtes gagnent le foie et débutent leur invasion des hépatocytes.

Au sein d'un hépatocyte infecté, la multiplication et le développement du parasite repoussent le noyau en périphérie de la cellule. Une masse multi nucléé que l'on nomme schizonte ou corps bleu se forme alors. La cellule éclate en libérant de nombreux mérozoïtes. En ce qui concerne *P. falciparum* le développement dure 6 jours avant que les mérozoïtes ne soient relargués dans la circulation sanguine où ils envahissent les érythrocytes (**Figure 2 A**).

Contrairement à *P. vivax* et *P. ovale*, les parasites peuvent persister dans les cellules du foie dans un état dormant appelé quiescence; cette cellule hépatique en sommeil est connu sous le nom d'hypnozoïte. Ils peuvent être réactivés à un moment ultérieur (plusieurs semaines ou mois plus tard) et établir une infection au stade sanguin. L'élément déclencheur de cette réactivation n'est pas encore complètement compris. Il faut noter que *P. falciparum* ne produit pas de stades hépatiques dormants et par conséquent aucune rechute ne survient à un moment ultérieur (les accès de reviviscence sont limités à 6 mois).

1.3.2 Le cycle érythrocytaire

Les mérozoïtes libérés suite à l'éclatement de l'hépatocyte, se retrouvent dans la circulation sanguine et pénètrent alors les hématies. Ils se transforment en trophozoïtes, un processus qui nécessite la consommation d'hémoglobine (une source de nutriments).

L'Hème, un sous-produit de cette réaction est polymérisé en cristaux inoffensifs d'hémozoïne ou pigments malariques pour faire face à son pouvoir toxique. Ce phénomène se produit dans la vacuole digestive (16). Dans le cas de *P. falciparum*, le parasite a la capacité de modifier les membranes et les transporteurs transmembranaires des cellules sanguines; la déformant et la rendant rigide, des antigènes de surface sont alors construits, les protéines parasitaires étant intégrées à la membrane, des protrusions (boutons) se forment exposant par la suite ces protéines de surface (KAHRP, PfEMP2, PfEMP3 et PfEMP1) en périphérie (17).

Ces modifications permettent aux cellules infectées d'adhérer à la couche de l'endothélium vasculaire des vaisseaux sanguins. Ces phénomènes sont respectivement appelés cyto adhésion, rosette et auto agglutination. Le parasite se multiplie ensuite par division asexuée et se transforme en schizonte. Ce dernier contient de multiples mérozoïtes qui sont activement relargués de la cellule hôte et peuvent alors aller réinfecter d'autres érythrocytes. A cause de ce phénomène de cyto adhésion, aucune forme mature de *P. falciparum* ne peut être détectée dans la circulation sanguine périphérique, un mécanisme qui permet au parasite d'échapper à la clairance splénique.

Après plusieurs schizogonies, les formes sexuées du parasite ou gamétocytes apparaissent (la maturation de gamétocytes dure 10 jours du stade I à IV) (**Figure 2 B**), et continuent la reproduction sexuée du cycle biologique de parasite, une fois absorbées par un moustique lors d'un repas sanguin.

Chaque cycle schizogonique dure entre 24 et 72 heures, en fonction de l'espèce; celui de *P. falciparum* dure 48 heures. Le cycle biologique de *P. falciparum* est continu durant la période d'infection et la densité d'érythrocytes infectés augmente graduellement, jusqu'à ce que l'immunité et/ ou un traitement puissent limiter la propagation (13).

L'hyperthermie ou poussées fébriles correspondent à l'éclatement des schizontes et le relargage de merozoïtes à travers la circulation sanguine. Cela stimule l'activation des macrophages et la production de cytokines pro-inflammatoires (principalement TNF- α) qui provoque la fièvre (13).

Cela se produit toutes les 48 heures pour *P. falciparum*, un intervalle de temps qui correspond à la période de schizogonie érythrocytaire.

1.3.3 Cycle chez l'anophèle femelle

Les gamétocytes issus de cycles successifs seront donc prélevés lors du repas sanguin du vecteur. Une fois chez le moustique les gamétocytes matures, la différences de température et de pH entre les deux hôtes, induit une division des gamétocytes mâles en 08 gamètes haploïdes, alors que les gamètes femelles gardent grossièrement leur morphologie et passent au stade gamète.

L'union de ces deux formes dure environ une heure. Elle donne naissance à un zygote diploïde qui deviendra un ookinète mobile. L'ookinète traverse la membrane péritrophique et l'épithélium du mésentéron du moustique pour s'installer entre la couche de cellules épithéliales et la lame basale, où il se transforme en un oocyste. Entre 5 et 10 jours plus tard, ce dernier libèrera près d'un millier de sporozoïtes haploïdes (5 000 à 10 000) qui gagneront les glandes salivaires, et y achèveront leur maturation (17). Les sporozoïtes traversent les cellules acinaires des glandes salivaires grâce à l'hémolymph, puis le canal salivaire, et peuvent être enfin injectés à un nouvel hôte vertébré lors du prochain repas sanguin (13).

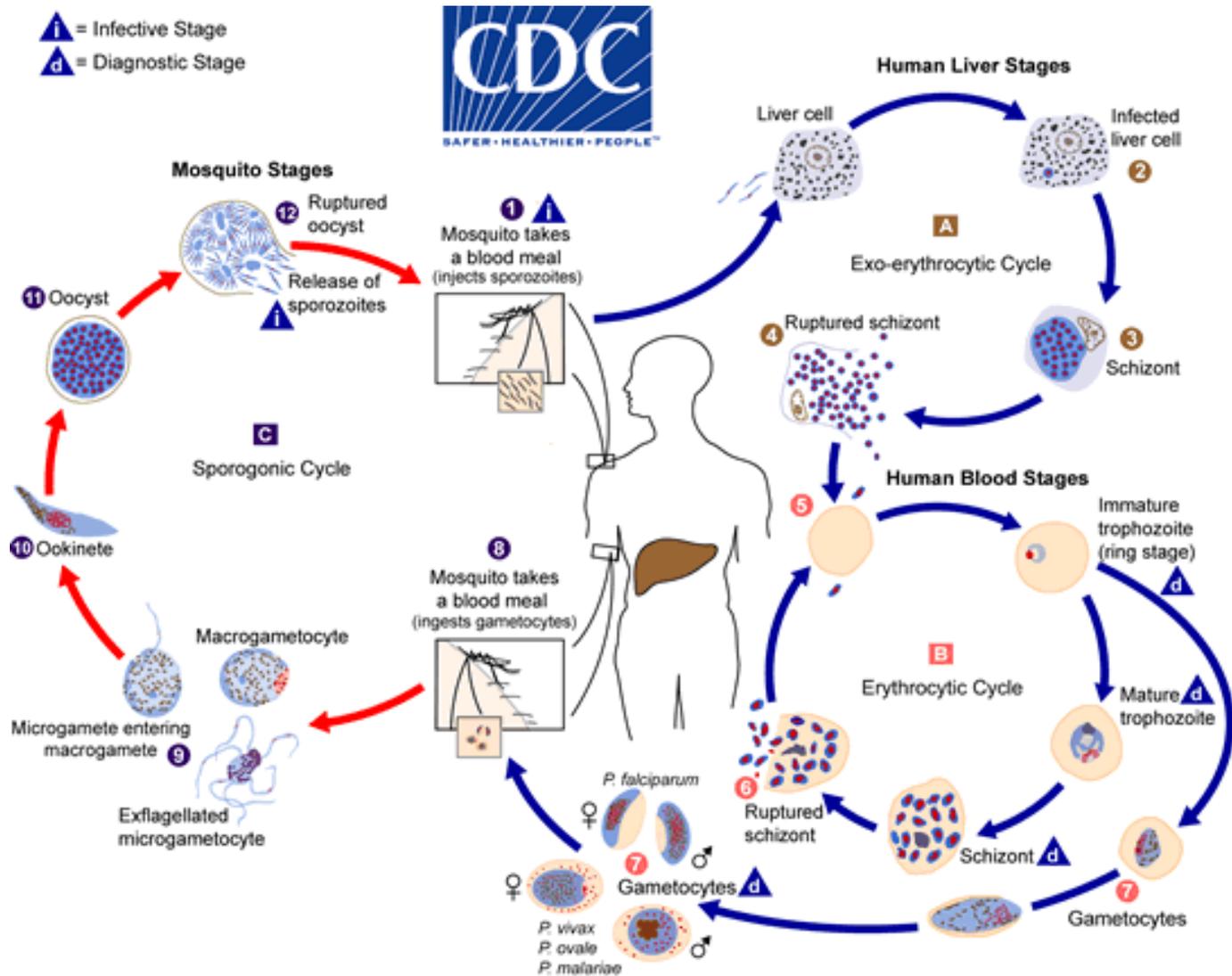


FIGURE 2 Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*

Source: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology>

1.4 Clinique et physiopathologie

Il existe deux types de paludisme: le paludisme simple, le plus courant et le paludisme grave.

Le paludisme simple de primo invasion atteint préférentiellement les sujets dit « non immun » : il touche l'enfant en zone d'endémie et le voyageur non immun (touriste ou migrant retournant en zone d'endémie qui a perdu son immunité). Ce sont donc de manière générale, les voyageurs, les jeunes enfants, les femmes enceintes, les sujets immunodéprimés et les personnes âgées qui seront particulièrement à risque de paludisme grave et donc de décès.

La clinique du paludisme simple à *P. falciparum* lors d'une primo-infestation, se déroule en 3 phases : l'incubation, l'invasion et la phase d'état.

(i) La phase d'incubation, qui varie d'une espèce à l'autre. Concernant *P. falciparum*, cette période s'étend de 7 à 15 jours et est asymptomatique car elle correspond à la schizogonie exo-érythrocytaire au niveau du foie. Il n'y a, à ce stade aucune atteinte des cellules sanguines.

C'est un stade asymptomatique comprenant la schizogonie exoérythrocytaire dans le foie (6 jours pour *P. falciparum*) et les premiers cycles de réplication dans le sang.

(ii) La phase d'invasion, qui se traduit par un syndrome pseudo grippal : fièvre continue accompagnée de frissons et sueurs. La fièvre peut également être accompagnée de céphalées, myalgies, malaises, et d'une hépatomégalie. L'évolution à ce stade est en général favorable en quelques jours en présence d'un traitement antipaludique adapté. En l'absence de traitement, la possibilité d'évoluer vers la phase d'état est élevée.

(iii) La phase d'état ou accès palustre à *P. falciparum* est caractérisée par une fièvre tierce maligne (parfois quotidienne) avec une température pouvant s'élever jusqu'à 40-41 °C. Cette fièvre correspond à la schizogonie érythrocytaire. Elle présente un pic ou accès fébrile toutes les 48h, avec frisson chaleur et sueur, suivi d'une phase d'apyrexie de 12h. Elle peut être accompagnée d'une splénomégalie et/ ou d'une anémie, si la parasitémie est élevée.

L'OMS définit le paludisme grave comme étant l'association de trophozoïtes de *P. falciparum* dans le sang avec au moins un critère de gravité. La complication majeure étant le neuro paludisme qui se traduit sur le plan physiopathologique par une anoxie et une encéphalopathie aigüe.

La distinction entre paludisme simple et grave est primordiale pour le traitement et a également été utilisée par le MMV pour définir les critères d'un Hit et d'un Lead. Concernant le paludisme simple, il est nécessaire que le traitement soit bio disponible par voie orale, alors que pour soigner un paludisme grave un traitement parentéral sera plus adéquat. Cette distinction clinique est réalisée sur une base pratique, en effet si le patient n'est pas capable de déglutir un médicament oral, l'infection parasitaire devra être traitée par voie parentérale.

1.5 Diagnostic

Le paludisme est caractérisé par la présence de parasites *Plasmodium* dans le sang périphérique associée à un tableau au sein duquel la fièvre occupe une place centrale.

Il existe tout d'abord un diagnostic clinique dit d'orientation, qui se construit autour de la symptomatologie. L'accès fébrile est donc le premier argument en faveur d'un paludisme. Cependant de nombreuses autres maladies infectieuses présentent un tableau clinique similaire. Sur le plan biologique, une infection parasitaire peut être appréhendée au niveau de la Numération de Formule sanguine (NFS) par une augmentation des globules blancs et plus précisément par une hyper éosinophilie.

Il y a ensuite le diagnostic direct, qui nous permet de détecter la présence ou l'absence de *Plasmodium* dans les érythrocytes, de préciser alors de quelle espèce il s'agit et enfin d'évaluer la parasitémie.

Différentes méthodes sont envisageables.

1.5.1 L'observation au microscope

Deux types d'outils sont utilisés: la goutte épaisse qui permet de détecter ou non la présence du parasite et le frottis sanguin qui permet d'établir un diagnostic d'espèce.

Pour préparer une lame contenant une goutte épaisse et un frottis, une micropipette est utilisée pour y placer 10 µl de sang pour la goutte épaisse et 3 µl pour le frottis.

Pour le frottis sanguin, le bord du bas de la lame d'étalement est utilisé pour répandre le sang. Pour la goutte épaisse, le coin en biseau de la lame d'étalement est utilisé pour répandre le sang jusqu'à ce que le cercle entier de 12 mm de diamètre soit recouvert uniformément. Il faut ensuite colorer la lame. Le frottis sanguin doit être fixé avant la coloration par immersion dans le méthanol pendant 10 secondes (18).

1.5.2 Test de diagnostic rapide

Le Test de Diagnostic Rapide (TDR) est basé sur la détection par immuno-chromatographie d'antigènes parasitaires dans le sang. Dans cette méthode, du sang périphérique est déposé et traverse une membrane de nitrocellulose, permettant la capture de l'antigène cible. En effet, un anticorps primaire spécifique d'un antigène parasitaire donné, est conjugué soit à un liposome contenant le colorant sélénium soit à des particules d'or dans une phase mobile et grâce à une interaction anticorps-antigène, il se complexe avec l'antigène cible. Un anticorps secondaire immobilisé sur la bande de la membrane de nitrocellulose capture ce complexe (19).

Ces tests peuvent être globalement divisés en quatre groupes en lien avec les quatre groupes principaux d'antigènes cibles.

Le premier groupe est constitué d'une protéine spécifique de *P. falciparum*, la protéine PfHRP2 (Histidin Rich Protein 2). *P. falciparum* synthétise 3 protéines HRP: HRP-1, HRP-2 et HRP-3. HRP-2 est une protéine hydrosoluble sécrétée par les stades asexués et les gamétocytes jeunes du parasite. C'est une protéine exposée à la surface des cellules sanguines.

Le second antigène cible est une lactate déshydrogénase du parasite (pLDH), une enzyme de la voie glycolytique avec différents isomères pour chaque espèce de *Plasmodium*, qui est produite par tous les stades sanguins du parasite : P.f pour *Plasmodium falciparum*, P.v pour *Plasmodium vivax* et Pan-LDH (commun pour toutes les espèces de *Plasmodium*).

Le troisième antigène est une aldolase de *Plasmodium*, une enzyme appartenant également à la voie glycolytique sécrétée par les quatre espèces.

Le quatrième antigène est spécifique de *P. vivax* (20).

Selon les perspectives de l’OMS en 2000

Selon les perspectives de l’OMS en 2000, concernant le diagnostic du paludisme à l’aide des TDR, la sensibilité des tests immuno-chromatographiques a été comparée à la microscopie. Ces nouveaux tests immuno-chromatographique peuvent détecter 100 parasites / μl (0.002% de parasitémie) (19).

En général, les tests de diagnostic rapide sont capables de détecter *Plasmodium falciparum* à une sensibilité supérieure à 90% et une spécificité approchant 100% pour une densité supérieure à 100-500 parasites / μl de sang, mais la sensibilité diminue rapidement à des densités inférieures de parasites (20).

Cependant c’est une méthode assez chère, qui ne permet pas parfois de détecter toutes les espèces et par-dessus tout, la positivité peut persister après la clairance de la parasitémie. Cette méthode ne peut remplacer la méthode de la goutte épaisse ou du frottis sanguin (19).

Un diagnostic précoce de la maladie permet une prise en charge optimale du patient et constitue une arme essentielle dans la lutte contre le paludisme.

1.6 Vaincre le paludisme

Dans la lutte contre le paludisme, il y a une multitude d’acteurs, principalement à une échelle mondiale et nationale dans la plupart des pays endémiques.

Cette lutte intègre différentes composantes: la prévention de la maladie, l’anticipation des challenges futures en développant des vaccins par exemple et le traitement (à l’aide des médicaments sur le marché ou de nouveaux composés).

En ce qui concerne la prévention, l’OMS recommande l’utilisation de moustiquaires imprégnées d’insecticides (MIIs) et la pulvérisation intra domiciliaire d’insecticide à effet rémanent. En 2014, la population ayant accès aux MIIs était estimée à 56% et 67% en 2015. Malheureusement, la proportion de la population dormant effectivement sous ces moustiquaires se révèle bien plus basse que la proportion ayant accès à ces moustiquaires (respectivement 46 et 55%). La prévention parmi les populations dites sensibles (enfants et femmes enceintes par exemple) doit être renforcée. Grâce au traitement préventif intermittent durant la grossesse, une

chimioprophylaxie pour les femmes enceintes semble possible. La proportion de cas suspects constitue également un aspect important des programmes de prévention, une confirmation par un test de diagnostic sensible et spécifique est requise (2).

A présent, le rêve absolu dans la lutte contre le paludisme réside en la découverte d'un vaccin efficace comme réelle solution pour résoudre l'équation. Le candidat vaccin RTS,S est le plus avancé dans le processus de développement. Il a atteint la phase III des essais cliniques, mais son efficacité chez les jeunes enfants est plus basse que prévu. Son utilisation a été acceptée par l'Agence Européenne des médicaments (EMA), cependant l'OMS ne l'a jusqu'à présent pas recommandé et a demandé pour plus de détails en phase IV des essais cliniques, en particulier concernant les cas de méningites (21).

Concernant les traitements disponibles, l'objectif principal est de mettre sur le marché des médicaments économiquement accessibles, grâce à la gestion du coût des marchandises par exemple (22).

L'OMS comme acteur principal essaye de synchroniser les efforts pour vaincre le paludisme et recommande l'utilisation de (CTA) combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine dans le but d'anticiper l'émergence de résistances.

Néanmoins, l'innovation autour de nouveaux composés semble être l'unique solution au long-terme pour anticiper ces problèmes concernant la résistance. Parmi ces solutions, le criblage de bibliothèques de composés semble être la meilleure manière de trouver des candidats médicaments antipaludiques prometteurs.

Le fond japonais "Global Health Innovative Technology" en partenariat avec le MMV pour *Medicines for Malaria Venture* ou TB Alliance a mis en place des critères dans les campagnes de screening, concernant 4 maladies infectieuses parmi lesquelles on retrouve le paludisme.

Ces critères permettent d'établir un TPP idéal pour « Target Product Profile » et un TCP pour « target candidate profile » pour un composé antipaludique. En 2013, Katsuno et ses collègues ont fourni une définition pour le TPP et le TCP: "The target product profiles (TPP) focus on the profile of a medicine that is composed of two or more active ingredients (a criterion that is

presently mandatory for artemisinin). By the contrast, the target candidate profiles (TCP) focus on attributes that individual molecules need to possess (acknowledging that one molecule may possess more than one attribute)".

Concernant le paludisme il existe 2 TPP: TPP1 appelé SERCap pour "Single exposure radical cure and prophylaxis" il se concentre sur le traitement et TPP2 pour "Single exposure chemo protection", ce dernier cahier des charges se focalise sur la prophylaxie

5 TCP se réfèrent spécifiquement à ces TPPs.

Il y a des TCP pour une clairance parasitaire rapide, pour une longue durée, pour la prévention de la transmission et la prévention de la rechute, ces derniers se réfèrent au TPP1 et un TCP autour de la chimioprophylaxie qui se réfère au TPP2.

Chaque TCP possède son gold standard. L'artémisinine est par exemple le gold standard pour une clairance parasitaire rapide (TCP1)(22).

De plus, les avancées en matière de génomique et technologies dérivées permettent en général, une meilleure compréhension des voie métaboliques, l'élucidation de la cible moléculaire d'un composé, et l'anticipation des problèmes de résistance (8).

1.7 Résistance aux médicaments antipaludiques

En 1967, l'OMS a défini la résistance comme étant la capacité d'une souche de *Plasmodium* à survivre et/ou se multiplier malgré l'administration et l'absorption correctes d'antipaludéens à la dose normalement recommandée mais comprise dans les limites de tolérance du patient.

Cette définition a été par la suite modifiée pour inclure la phrase " la forme active du médicament doit pouvoir atteindre le parasite ou l'érythrocyte infecté le temps nécessaire à son action"

Jusqu'à présent, des cas de résistance ont été rapporté avec trois des cinq espèces de plasmodies affectant l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae*.

Plasmodium falciparum est l'espèce la plus concernée par le phénomène de résistance, qui a été relaté avec la plupart des médicaments antipaludiques (23).

La Chloroquine a été pendant des dizaines d'années l'antipaludique par excellence. Le développement de nouveaux médicaments a donc été négligé durant cette période. Les parasites sont devenus plusieurs fois, et de façon indépendante résistants à la chloroquine : en Colombie, proche de la frontière entre la Thaïlande et le Cambodge puis au Venezuela, en Papouasie-Nouvelle-Guinée et finalement aux Philippines durant la fin des années 1950. De ces foyers, des souches résistantes se sont propagées à travers l'Amérique du Sud, l'Asie du Sud Est, l'Inde et finalement l'Afrique à la fin des années 1970 (16).

Concernant la chloroquino-résistance, l'émergence des résistances fut liée à la haute diversité génétique de *P. falciparum*. En effet, la résistance à la chloroquine sur le plan clinique a été fortement associée à des substitutions génétiques dans le transporteur de résistance à la chloroquine de *Plasmodium falciparum*, *Pfcr1* (PF3D7_0709000) avec le remplacement de la lysine par une thréonine au codon 76 par exemple (K76T) (24). C'est un gène codant pour un transporteur qui expulse la chloroquine à l'extérieur de la vacuole digestive du *Plasmodium* (25).

La chloroquino-résistance a été définie en particulier pour les cultures continues comme étant " la capacité confirmée à survivre à la concentration de 100 nM ou 33ng/mL de chloroquine basée sur les conditions standards de cultures continues et de chimiosensibilisation de la chloroquine à 1µM de vérapamil " (16).

Avec l'intention de combattre la chloroquino-résistance, pendant les années 1980, le traitement de première intention du paludisme a changé en faveur des inhibiteurs de folates : sulfadoxine-pyriméthamine. Mais la résistance n'a cessé sa diffusion du Sud-Est asiatique à bientôt toutes les régions endémiques (25). Cette combinaison thérapeutique est toujours utilisée pour le traitement préventif intermittent chez la femme enceinte (2).

Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sont désormais le traitement de 1^{ère} intention dans tous les pays endémiques. En janvier 2011, l'OMS a dévoilé le plan mondial de maîtrise de la résistance à l'artémisinine (GPARC), appelant les pays et les partenaires

mondiaux investis contre paludisme à instaurer une stratégie basée sur cinq piliers pour contenir et prévenir la résistance à l'artémisinine.

Ce plan a donc pour objectif de contenir ou d'éliminer la résistance à l'artémisinine où elle existe déjà (sous-région Bassin du Mékong) (26) et pour la prévenir dans les zones où elle n'est pas encore apparue (27).

Ce plan offre une définition précise de la résistance à l'artémisinine:

- Une augmentation du temps de clairance parasitaire, mise en évidence par
- une augmentation du temps d'élimination du parasite, mise en évidence dans 10% des cas avec des parasites détectables 3 jours après traitement avec un CTA (cas possibles de résistance); ou

- l'échec après le traitement avec une monothérapie orale à base d'artémisinine à une concentration sanguine antipaludique adéquate, mise en évidence par la persistance des parasites pendant 7 jours, ou la présence de parasites au jour 3 et une recrudescence dans les 28/42 jours (résistance confirmée) (27).

Les mutations dans la région du génome de *Plasmodium* appelée hélice K13 sont prédictives d'une résistance à l'artémisinine *in vitro* dans le Sud Est asiatique. K13 appartient à la superfamille de protéines kelch (28).

Pour anticiper ces phénomènes de résistance, une des réponses réside dans le développement et la diversification du portefeuille médicamenteux.

1.8 Portefeuille antipaludique 2016 et description des deux familles de composés

1.8.1 Portefeuille antipaludique 2016

Le MMV considère que le portefeuille antipaludique 2016 possède le portefeuille le plus diversifié en projets de R&D de toute l'histoire. Durant les dix dernières années, le portefeuille antipaludique n'a cessé d'être étoffé avec de nouvelles entités chimiques. On observe non seulement de nouvelles classes de molécules mais aussi de nouvelles façons de collaborer (comme par exemples les industries travaillant avec les académies) dans le but d'accélérer le développement de nouveaux traitements antipaludiques. A l'avenir, il est nécessaire de chercher des nouvelles solutions pour cibler *Plasmodium* (29).

Tableau 1 Antimalarial pipeline 2016

Global portfolio of antimalarial medicines	Medicines	Indication, TPP & TCP (Approach in Drug Discovery; Target in the life cycle)
Research (Lead optimization) and Preclinical studies Phase I (Human volunteers)	A total of 25 compounds are in lead optimization and preclinical studies.	
	MMV048 (UCT/TIA)	<ul style="list-style-type: none"> • Asexual blood stage activity (TCP1,2) • Transmission reduction (gametocytocidal or sporontocidal) (TCP3b) • Chemoprevention (TCP4)
	ACT-451840 (Actelion)	<ul style="list-style-type: none"> • Asexual blood stage activity (TCP1,2)

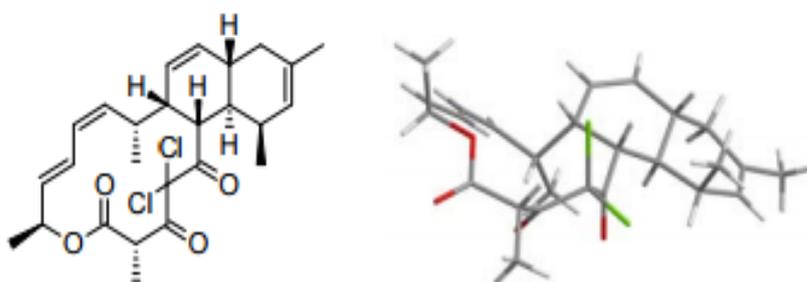
	CDRI 9778 (Ipsa)	<ul style="list-style-type: none"> No progress report in the last two years
	N-tert butyl Isoquine (LSTM/Liverpool/GSK)	<ul style="list-style-type: none"> No progress report in the last two years
	SJ733 (St Jude/Eisai)	<ul style="list-style-type: none"> Asexual blood stage activity (TCP1,2) Transmission reduction (gametocytocidal or sporontocidal) (TCP3b)
Phase II (Patient exploratory)	OZ439/FQ (Sanofi)	<ul style="list-style-type: none"> New compounds to contribute to SERCAP or Multiple exposure treatment for multidrug resistance (TPP1) Asexual blood stage activity (TCP1,2) Transmission reduction (gametocytocidal or sporontocidal) (TCP3b)
	KAE609 (Novartis)	<ul style="list-style-type: none"> New compounds to contribute to SERCAP or Multiple exposure treatment for multidrug resistance (TPP1) Asexual blood stage activity (TCP1,2) Transmission reduction (gametocytocidal or sporontocidal) (TCP3b)
	KAF156 (Novartis)	<ul style="list-style-type: none"> New compounds to contribute to SERCAP or Multiple exposure treatment for multidrug resistance (TPP1) Asexual blood stage activity (TCP1,2) Transmission reduction (gametocytocidal or sporontocidal) (TCP3b) Chemoprevention (TCP4)
	DSM265 (UTSW/UW/Monash)	<ul style="list-style-type: none"> Asexual blood stage activity (TCP1,2) Chemoprevention (TCP4)
	Fosmidomycin Piperquine (Jomaa Pharma/GmbH)	
	Methylene Blue/AQ (Heidelberg)	<ul style="list-style-type: none"> No progress report in the last two years
	SAR97276 (Sanofi)	<ul style="list-style-type: none"> No progress report in the last two years
	Artemisone (UHKST)	<ul style="list-style-type: none"> No progress report in the last two years
	AQ13 (Immtech)	<ul style="list-style-type: none"> No progress report in the last two years
	Sevuparin (Dilaforette)	
Phase III (Patient confirmatory*, Regulatory review**)	Tafenoquine* (GSK)	<ul style="list-style-type: none"> New compounds to contribute to SERCAP or Multiple exposure treatment for multidrug resistance (TPP1) Relapse prevention (TCP3a)

	Dihydroartemisinin piperazine Paediatric* (Sigma-Tau)	-
	Co-trimoxazole* (ITM Antwerp)	
	Artemisinin Naphthoquine * (KPC)	Approved in several countries but not approved by Stringent Regulatory Authority nor WHO pre-qualification.
	Artemether sub-lingual spray* (Photo Pharma Ltd)	
	Rectal Artesunate ** (Cipla/Strides/WHO-TDR)	<ul style="list-style-type: none"> • Severe malaria • Pending review or approval by WHO pre-qualification, or by regulatory bodies who are ICH members or observers
	Arterolane/ Piperazine** (Sun Pharmac)	Approved in several countries but not approved by Stringent Regulatory Authority nor WHO pre-qualification
Phase IV (post approval)	Artemether-lumefantrine Dispersible Coartem® Dispersible (Novartis)	3 day treatment products (TPP1)
	Artesunate for injection Artesun® (Guilin)	<p>It is an optimized therapy with existing agents. Artemether is an artemisinin related compound. Molecular target of artemisinin is unknown but it is located in Food vacuole and used a free radical generation pathway.</p> <p>Severe malaria</p> <p>Artesunate is an artemisinin related compound.</p>
	Dihydroartemisinin-piperazine Eurartesim® (Sigma-Tau)	3 day treatment products (TPP1)
	Pyronaridine-Artesunate Pyramax® (Shin Poong)	3 day treatment products (TPP1)
	Pyronaridine-artesunate Paediatric (Shin Poong)	

Artesunate-amodiaquine* Coarsucam™ ASAQ/Winthrop® (Sanofi/ DNDi)	<ul style="list-style-type: none"> • Pending review or approval by WHO pre-qualification, or by regulatory bodies who are ICH members or observers • Brought into portfolio after approval. Collaboration with DNDi • 3 day treatment products (TPP1)
Artesunate-mefloquine (Cipla/DNDi)	<ul style="list-style-type: none"> • Pending review or approval by WHO pre-qualification, or by regulatory bodies who are ICH members or observers • Brought into portfolio after approval. Collaboration with DNDi • 3 day treatment products (TPP1)
SPAQ SPAQ-CO™ (Guilin)	Seasonal malaria chemoprevention

Sources: adapté de Medicines for Malaria Venture (MMV) 2016 (30), et du travail de Rosenthal et ses collègues (6).

1.8.2 Les métabolites dérivés du macrolide myxobactérien Chlorotonil A



Description de la Structure

Le composé Chlorotonil A, montre une fonction *gem*-Dichloro-1, 3-diones unique. Cette fonction se trouve au sein d'un cycle lactone à 14 atomes de carbone. Cette structure a été élucidée par méthodes spectroscopiques, incluant la cristallographie au rayon X.

FIGURE 3 Structure chimique du composé Chlorotonil A

Source: figure issue du travail de Gerth et ses collègues (31)

Le composé Chlorotonil A, est un macrolide tricyclique isolé de la myxobactérie *Sorangium cellulosum* So ce1525. Les myxobactéries sont des bactéries Gram négatif vivant dans le sol et appartenant à l'embranchement des *Proteobacteria*.

Ce métabolite contenant un chlore, a été examiné plus en détail pour son activité antipaludique à la suite d'une campagne de criblage de substances myxobactériennes à l'institut Tropical et de Santé Publique Suisse. Bien que le composé Chlorotonil A soit hautement actif, il démontre une faible solubilité dans les solvants organiques et dans l'eau. C'est pourquoi les dérivés chimiquement modifiés du composé Chlorotonil A sont testés dans cette étude, ils possèdent une meilleure solubilité que le composé parent et nous espérons qu'ils démontreront, pour une activité comparable une meilleure biodisponibilité *in vivo*.

Le composé Chlorotonil A agit *in vitro* contre des isolats cliniques et de laboratoire de *P. falciparum*. Ce composé parent est un inhibiteur *in vitro* puissant de la croissance des souches 3D7 (chloroquino-sensible) et Dd2 (chloroquino-résistante) de *P. falciparum*. Il cible rapidement tous les stades sanguins du parasite (le développement des stades anneaux et trophozoïtes est bloqué par le composé Chlorotonil A), réduit la biomasse parasitaire et l'émergence des toxines parasitaires. Le composé est également actif *in vivo*, cela a été démontré grâce l'essai « Peters 4-day suppression » dans des modèles murins: la souris BALB/c infectée pour la souche *P. berghei* ANKA et la souche CD1 de type suisse. Enfin, le composé est actif contre les gamétocytes (les derniers stades IV et V) cela a été attesté grâce à un essai *in vitro* de bioluminescence (32).

1.8.3 Les métabolites dérivés du motif tropone et isolés de la souche *Penicillium* sp FKI-4410

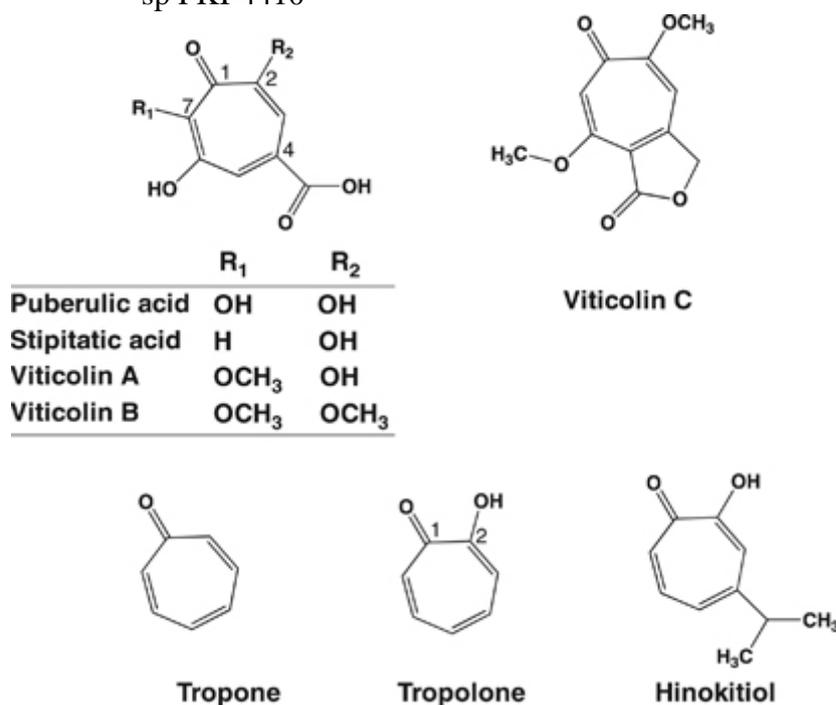


FIGURE 4 Structures chimiques de l'acide pubérulique et des dérivés de tropones

Description de la Structure

L'hinokitiol et la tropolone possèdent un hydroxyle libre en C-2, un groupement qui est nécessaire pour l'activité d'inhibition de la *pf*GLOI (en comparaison à la tropone, qui ne possède pas ce groupement et donc ne démontre pas d'activité d'inhibition contre cette enzyme). Le plus puissant des composés, l'acide pubérulique montre une activité modérée d'inhibition et l'acide stipitatic ainsi que les composés viticolins A, B, and C ne démontrent aucune activité d'inhibition.

Source: figure issue du travail d'Ishiyama et collègues (33)

Les composés dérivés du motif tropone ont été isolés du bouillon de culture de *Penicillium* sp FKI-4410. L'organisme producteur, la souche FKI-4410, qui est considérée comme une nouvelle espèce appartenant au genre *Penicillium* a été appelée *Penicillium viticola* sp. nov (34).

Il a été rapporté, que plusieurs apparentés de la tropone possédant une activité d'inhibition contre la γ GLOI (yeast glyoxalase I), ont également démontré *in vitro* une activité antipaludique. *P. falciparum* emprunte principalement la voie métabolique de la glycolyse pour produire de l'énergie, la glyoxalase I monomérique de *P. falciparum* (*pf*GLOI) est impliquée dans cette voie métabolique.

La GLOI (EC 4.4.1.5) est une isomérase qui catalyse la formation du S-D-lactoylglutathion à partir du produit dérivé métabolique toxique méthylglyoxal (MG). Ce MG est réduit en glutathion dans une voie glycolytique.

Cette enzyme (*pf*GLOI) est la cible de nombreux programmes de développement d'antipaludiques, en particulier dans notre étude concernant l'acide pubérulique et les dérivés de la tropone (33).

Dans cette étude, 12 métabolites myxobactériens et 4 métabolites du *Penicillium* ont été testés dans le but d'évaluer leur activité contre les stades sanguins asexués de *P. falciparum* ainsi que leur cytotoxicité contre une lignée de cellules humaines (les cellules HeLa). Leur activité a été comparée au modèle antipaludique standard, la chloroquine.

II- Matériels et Méthodes

2.1 Maintenances des cultures

2.1.1 Culture parasitaire

2.1.1.1 Matériels pour la culture parasitaire

<u>Equipement</u>	<u>Mise en place</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Incubateur Hera Cell 150i Thermo electron corporation (37°C, 5% CO₂ et 5% O₂; 98% d'humidité) • Centrifugeuse • Une hotte à flux laminaire Hera safe 	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu complet <ul style="list-style-type: none"> ➤ RPMI 1640 (bouteille SIGMA de 500 mL) ➤ Albumax congelé 50 mL, ➤ Hepes (1 M) solution de 12 mL

-
- Des flasques de culture cellulaire jaune T-75 (avec une aire de croissance de 75 cm² et un volume total de travail de 21 mL)
 - Pipettes graduées
 - Tubes stériles
 - Colonne MACS Multistand
 - LD colonne MACS Miltenyi Biotec
 - Lames en verre
 - Microscope Leica DM 1000
 - Un bain-marie atteignant une température idéale 37°C
 - Cryotube
 - Tubes falcon
- Gentamicine (50 mg/mL) 500 µL
 - L-Glutamine (200 mM) 6 mL (bien secouer à cause des dépôts éventuels)
- Préparation d'une solution d'**Albumax** de 500 mL
 - 5,2 g de RPMI 1640 (sous forme de poudre conservée à 4°C dans le réfrigérateur)
 - 2,98 g d'Hepes (en poudre) ou 12 mL
 - 1,67 g de Bicarbonate NaHCO₃
 - 1 g de Glucose
 - 25 g d'Albumax II
 - 0.1 g d'Hypoxanthine
 - 500 µL de Gentamicine stérile, toujours à la fin.

Matériels et réactifs

- Echantillons de sang parasité [Deux souches de *P. falciparum* 3D7 (chloroquine sensible) et Dd2 (chloroquine, sulfadoxine, et pyriméthamine résistante) ont été utilisées]
 - Erythrocytes purifiés (sang de type O+ SAG Mannitol) conservé à 4°C
 - Milieu complet
 - Solution stérile de NaCl (12% et 1.6%)
 - Méthanol
- Cette solution doit être filtrée et atteindre un pH de 7.0-7.4
- **Tampon Phosphate (10x)**
 - 0.41 g de KH₂PO₄
 - 0.58 g de Na₂HPO₄
 - Compléter jusqu'à 1 L et vérifier le pH de la solution, qui doit atteindre 7. 1. Ensuite il faut autoclaver cette solution.
-

-
- Giemsa (5% dans du PBS 1x)
 - Huile à immersion
 - Sorbitol (5% dans de l'eau distillée)
 - Glycérol
 - Solution de tampon phosphate 1x, autoclavée et à pH 7.1.
-

2.1.1.2 Méthode pour la culture parasitaire

❖ ETAPE 1: Décongeler une culture de <i>P. falciparum</i>

1] Sortir du réfrigérateur les solutions de NaCl de 1,6% et 12% et l'échantillon de culture de sang congelé hors du congélateur à -80°C et le placer dans la glace (jusqu'à ce que tout soit prêt).

2] Décongeler l'échantillon se trouvant dans le cryotube dans un bain marie à 37°C (ce processus est assez rapide).

3] Utiliser une pipette de 1 mL pour retirer le volume se trouvant à l'intérieur du cryotube et placer la culture parasitaire dans un tube falcon de 50 mL.

4] Ajouter la solution de NaCl à 12% goutte à goutte dans le tube falcon de 50 mL contenant la culture parasitaire dans le but de prévenir la lyse des érythrocytes. Puis laisser la culture à température ambiante pendant 5 minutes.

5] La solution de NaCl à 1,6% est ensuite ajoutée goutte à goutte au falcon tube de 50 mL contenant la culture et la solution de NaCl à 12%. Maintenir l'agitation du tube falcon.

6] Centrifuger le tube falcon de 50 mL pendant **5 minutes** à **1800xg** à température ambiante. Retirer le surnageant.

7] Ajouter le milieu complet goutte à goutte au tube falcon de 50 mL et maintenir l'agitation du tube.

8] Centrifuger le tube falcon de 50 mL pendant **5 minutes** à **1800xg** à température ambiante. Enlever le surnageant.

9] Transférer le culot du falcon tube à la bouteille de culture.

10] Une flasque de culture jaune est utilisée: Compléter la bouteille pour atteindre 500 µL d'érythrocytes et ajouter 19,5 mL de milieu complet pour obtenir un total de 20 mL. Placer la flasque à l'incubateur.

❖ ETAPE 2: Maintenance d'une culture de <i>P. falciparum</i>

11] Placer le milieu complet dans un bain marie de 37°C et sortir du réfrigérateur à 4°C du sang frais O+, les placer sous la hotte.

12] Sortir les bouteilles de culture de l'incubateur en évitant de secouer la bouteille.

13] Retirer et jeter l'ancien milieu avec une pipette de 25 mL en inclinant la bouteille d'un côté, ce qui permet alors de prélever le milieu dans un coin de la bouteille de culture sans agitation du sang qui s'est déposé au fond de la bouteille.

14] Prendre une nouvelle lame et l'annoter: initiales, date et type de culture (3D7, Dd2).

15] Utiliser une pipette de 1 mL, réaliser une goutte épaisse et évaluer la parasitémie qui doit atteindre 1%.

16] Différents types de dilutions avec du milieu complet et du sang frais sont réalisées en fonction, de la taille de la bouteille, de la croissance de la culture et de la parasitémie. Pour les flasques jaune : 500 µL d'érythrocytes et 20 mL de milieu.

17] Remettre la flasque à l'incubateur.

18] Pour tester la chimio sensibilité des stades sanguins asexués de *P. falciparum*, une culture synchroniser est requise.

Cela peut être réalisé en resuspendant selon un protocole particulier la culture dans du D-sorbitol à 5% (35).

Ou en utilisant une colonne magnétique (grâce à la méthode MACS, pour Magnetic Activated Cell Sorting) qui isole les schizontes des stades sanguins asexués anneaux (36).

❖ **ETAPE 3:** Congeler une culture de *P. falciparum*

19] Retirer la flasque de l'incubateur et la transférer dans un tube falcon de 15 mL.

20] Centrifuger le falcon à **1800xg** pendant **3 minutes**. Retirer le surnageant et mesurer le culot.

21] Ajouter goutte à goutte le glycérol avec un volume équivalent à **1/3** du volume du culot avec une pipette de 1 mL et mélanger rapidement.

22] Incuber la culture pendant **5 minutes** à température ambiante.

23] Ajouter goutte à goutte le glycérol avec un volume équivalent à **4/3** du culot à l'aide d'une pipette de 1 mL et mélanger rapidement.

24] Transférer la solution homogène dans un cryotube et le placer rapidement dans le congélateur à -80°C.

2.1.2 Culture cellulaire

2.1.2.1 Matériels pour la culture des cellules HeLa

Equipement

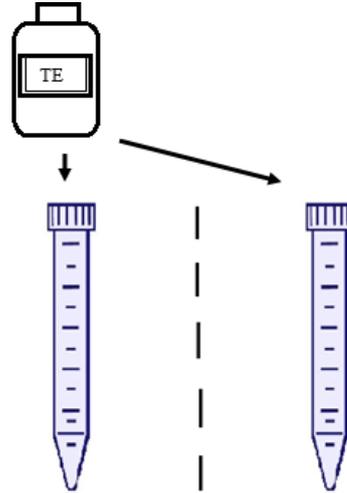
- Incubateur Hera Cell 150i Thermo electron corporation (37°C, 5% CO₂, 98% of humidity)
- Centrifugeuse

Mattériels and réactifs

- Bouteille de DMEM (1X) de 500 mL, Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco® by life technologies®:
 - [+] 4,5 g/L de D-Glucose
-

-
- Une hotte à flux laminaire Hera safe
 - [+] L-Glutamine
 - [-] Pyruvate
 - Flasques de culture cellulaire jaune T-75 (avec une aire de croissance totale de 75 cm² et un volume de travail de 21 mL)
 - Reference: 41 965-039
 - FBS Fetal Bovine Serum, Gibco® par life technologies® bouteille de 500 mL:
 - Référence: 10 270-106
 - Aliquoté avec au moins 30 mL à l'intérieur de chaque tube falcon.
 - CMF-PBS Calcium-magnesium free-phosphate buffered saline
 - TE Trypsin EDTA (0.05%)
 - TB colorant Trypan blue à 0.04%
 - Flasques de culture cellulaire rouge T-25 (avec une aire de croissance totale de 25 cm² et un volume de travail de 7 ml)
 - Pipettes et cônes
 - Tubes stériles
 - Microscope inversé Wild Heerbrugg (obj: DiN 0.25)
 - Un bain marie à la température idéale de 37°C
 - Cryo-tube
 - tubes falcon
- Mise en place
- DMEM- 10% de FBS
- Ajouter 25 mL de FBS à 225 mL de DMEM ou 55 mL pour une bouteille de 500 mL de DMEM.
- CMF-PBS
 - 0.2g KCl
 - 0.2g KH₂PO₄
 - 8.0g NaCl
 - 1.15g Na₂HPO₄
- Compléter à 1 L avec de l'eau distillée et autoclaver.
- Vérifier le pH, qui doit être autour de 7.0- 7.4.
- Ne pas mettre de savon dans les bouteilles de PBS
- Trypsin- EDTA (0.05%)
-

Décongeler la bouteille de 100 mL et un aliquot de 6 mL (comme ci-dessous). Garder un falcon tube dans le réfrigérateur à 4°C



All the tubes are keeping in the freeze at -20°C and labeled with "TE 0.05%, Initials, volume and expiration date"

One falcon tube is keeping on the refrigerator at 4°C for working.

- Milieu de congélation
 - 7.5% de DMSO dans du milieu standard.

Ajouter 1.5 mL de DMSO à 18.5 mL de milieu HELA dans un tube de 50 mL tube. Filtrer à l'aide d'une seringue filtre de 0.22 et conserver tous les tubes à -20°C.

2.1.2.2 Méthode pour la culture des cellules HeLa

❖ ETAPE 1 : Décongeler les cellules HeLa

⚠ Il est important que tout soit prêt avant de récupérer le flacon, pour minimiser le temps où les cellules qui se décongèlent sont exposées à de fortes concentrations de DMSO.

1] Dispenser **10 mL** de milieu complet dans un tube stérile de 15 mL et réchauffer ce tube dans un bain marie de 37°C.

2] Retirer le flacon congelé de l'azote liquide et le placer dans la glace jusqu'à ce que tout soit prêt.

3] Décongeler le flacon dans un bain marie de 37°C

⚠ L'anneau et le bouchon doivent être maintenus hors de l'eau pour prévenir toute contamination.

4] Retirer le flacon de l'eau dès que le contenu soit décongelé.

5] Après décongélation, vaporiser le flacon entier avec EtOH à 70% et le placer sous la hotte.

6] Retirer la suspension cellulaire du flacon avec une pipette de 1 mL et ajouter goutte à goutte au 10 mL de milieu pré chauffé.

7] Concentrer les cellules par centrifugation à **1000 rpm** pendant **5 minutes**.

8] Aspirer le milieu usé avec une pipette. Ne pas disperser le culot cellulaire mais en tentant de retirer tout le milieu usé.

9] Disperser le culot cellulaire en tapotant délicatement le tube et en exerçant de légers mouvements pour prévenir des clumping, du milieu est ajouté.

10] Ajouter doucement **5 mL** de milieu frais dans le tube. Resuspendre les cellules en pipettant délicatement. A la fin rincer le tube avec de nouveau **5 mL**.

11] Transfère la suspension cellulaire à une flasque T25 et la placer dans l'incubateur pour la nuit.

12] Le jour suivant, aspirer le milieu usé et le remplacer avec du milieu frais. Un passage devant être réalisé de préférence lorsque les cellules présentent **70-80%** de confluence car les cellules subissent un meilleur passage lorsqu'elles croissent de façon logarithmique.

❖ ETAPE 2 : Maintenance des cellules HeLa

- ⚠ Évitez la trypsinisation répétée des cellules se trouvant en culture, car cela sélectionne des cellules résistantes à la trypsine. Les cellules doivent être utilisées dans un maximum de 25 passages (à partir des stocks d'origine). Effectuer de préférence les expériences dans une fenêtre 20 passages.

JOUR 1: PASSAGE

13] Inspecter la culture pour attester qu'elle n'est pas contaminée. Les cellules doivent atteindre 70-80% de confluence.

14] Préchauffer le **milieu complet HeLa** et la **TE à 0,05%** dans un bain marie de 37°C pendant 15-20 minutes.

15] Aspirer le milieu usé de la flasque à l'aide d'une pipette de 10 mL.

16] Laver environ 15 secondes les cellules avec du **CMF-PBS** (calcium-magnesium free-phosphate buffered saline) pour enlever d'éventuels résidus de milieu, 5 mL pour une flasque T25 et 15 mL pour une T75. Aspirer avec une pipette.

17] Ajouter 1 mL de TE à 0,05% à la flasque T-25 (3 mL pour une flasque T-75) et éventuellement disperser par balancement. Après décongélation, la TE peut être conservée à 4°C jusqu'à **2 semaines**.

- ⚠ Eviter le phénomène de congélation-décongélation.

18] Placer la flasque dans l'incubateur avec le capuchon fermé **hermétiquement**. Sortir la flasque toutes les **2 minutes** pour vérifier la progression du détachement. Noter la durée du processus.

19] Lorsque les cellules sont détachées, ajouter **5 mL** de nouveau milieu et rincer la surface de la flasque T-25 (**15 mL** pour une flasque T-75). Pipetter plusieurs fois de haut en bas pour dissocier les amas cellulaires. Vérifier brièvement sous le microscope pour confirmer que les cellules sont dispersées dans la suspension de façon individuelle (> 80%) et que les amas

éventuels présentent tout au plus 5 cellules. Si ce n'est pas le cas, pipetter de haut en bas 3 fois de plus maximum.

⚠ **Minimiser la mousse**, mal tolérée par les cellules.

20] Transférer une petite quantité (<0.5 mL) dans un microtube pour compter les cellules de l'échantillon.

21] Prélever **10 µL** de cette suspension cellulaire pour le mélanger à **10 µL** à 0,4 % de Bleu de Trypan (**TB**) pour les compter.

22] Calculer le volume de suspension cellulaire nécessaire pour obtenir la densité désirée.

- Transférer 10 µL du mélange ci-dessus dans une cellule de comptage
- Compter le nombre de cellules au sein d'un ensemble de 16 carrés, 4 ensembles au total.
- Exemple de calcul:

Comptes = 83, 85, 82, et 86

Moyenne = 84

$336/4 \times 10^4 \times 2$ (facteur de dilution) = **1,68 x 10⁶ cellules/mL**

Total de cellules = 1,68 x 10⁶ cellules/ml x **10 mL** (volume total) = **1,68 x 10⁷ cellules**.

23] Ajouter le volume approprié de suspension cellulaire à la nouvelle flasque (2×10^4 cellules/cm² × 25 cm²) et suffisamment de milieu frais pour atteindre **10 mL** au total dans une flasque T-25 (20 mL pour une flasque T-75). Ce moment est également idéal pour passer d'une flasque T-25 à une flasque T-75.

24] Remettre la flasque dans l'incubateur.

JOUR 3: CHANGER LE MILIEU

25] La culture est inspectée au microscope pour prévenir toute contamination.

26] Aspirer à l'aide d'une pipette le milieu usé de la flasque.

27] Ajouter **9 mL** de nouveau milieu (ou **19 mL** pour une flasque T-75).

JOUR 5: PASSAGE

28] Traiter les cellules de la même façon qu'au JOUR 1, mais si. Si les cellules sont confluentes à plus de 100%, ajuster la densité.

Traiter les cellules de façon similaire JOUR 1, avec une densité de 4×10^4 cells/cm².

❖ ETAPE 3 : Congeler Les Cellules HeLa

29] Chauffer un aliquot de **TE** de 6 mL (à 0,05%) et le **milieu HeLa**.

30] Préparer le **milieu de congélation** (voir la section Matériels et mise en place des réactifs) et le placer **dans la glace**.

31] Préparer 5-10 flacons pour une flasque T-75, les labelliser en indiquant:

- Le type cellulaire (HeLa)
- Le nombre de passages
- La date
- Et le nombre de cellules (1×10^6 ou 2×10^6).

32] Aspirer à l'aide d'une pipette le milieu usagé de la flasque.

33] Laver la flasque avec **15 mL** de CMF-PBS pour retirer toutes traces de milieu (~ 15 sec).

34] Aspirer à l'aide d'une pipette.

35] Ajouter **3 mL** de TE à la flasque en recouvrant toute la surface.

36] Placer les cellules à l'incubateur pendant **2 minutes** et constater le détachement.

37] Ajouter **15 mL** de milieu frais en rinçant la surface de la flasque. Pipeter 6 fois du bas vers le haut, pour dissocier les amas cellulaires. Vérifier brièvement sous le microscope la dispersion des cellules de façon individuelle (>80%) et que tout amas possède tout au plus 5 cellules.

38] Transfer une petite quantité (<0.5 mL) dans un microtube pour évaluer le nombre de cellules de l'échantillon.

39] Concentrer les cellules par centrifugation à 800 rpm (**100 g**) pendant **5 min**.

40] Pendant que les cellules sont centrifugées, déterminer le nombre de cellules/mL. Calculer le nombre total de cellules dans le tube puis le volume de milieu de congélation à ajouter pour obtenir 5×10^6 par mL.

41] Aspirer le milieu usagé avec une pipette.

42] Disperser le culot cellulaire en tapotant doucement le tube, puis resuspendre dans le volume calculé de milieu de congélation préalablement refroidi.

43] Distribuer 1 mL de la suspension cellulaire dans chaque tube et les placer dans la glace.

44] Mettre les tubes dans une boîte labellisée et la conserver au congélateur à -80°C .

2.2 Test de la chimio sensibilité

2.2.1 Matériels pour tester la chimiosensibilité des composés contre les stades sanguins asexués de *P. falciparum*

<u>Equipement</u>	<u>Matériels et réactifs</u>
<ul style="list-style-type: none">• Incubateur Hera Cell 150i Thermo electron corporation (37°C, 5% CO_2 et 5% O_2, 98% d'humidité)• Un lecteur de plaque ELISA (avec un filter de reference à 450 nm et 620 nm)• Une hotte à flux laminaire Hera safe• Des flasques de culture cellulaire jaune T-75 (avec une aire de croissance de 75 cm^2 et un volume total de travail de 21 mL)• pipettes• Une pipette multicanaux 12 puits	<ul style="list-style-type: none">• PBS Sigma- Aldrich• Tween 20, Sigma Aldrich• BSA Sigma Aldrich• Solution bloquante• TMB, Zymed Laboratories• Acide sulfurique• MPFM-45A (Anticorps primaires IgM), Immunology Consultants Laboratories• MPFG-45P (Anticorps secondaires IgG), Immunology Consultants Laboratories

-
- Plaques ELISA 96 puits

Mise en place

- Solution bloquante

Préparer une solution de sérum albumine bovine (SAB) à 2% dans du PBS (Pour chaque plaque dissoudre 0.4 g de SAB (Sigma, CAS No. 9048-46-8) dans 19.6 mL de PBS).

- Solution de lavage PBS/Tween 0,05%

Ajouter 0.5 ml de Tween 20 à 999.5 mL de PBS.

- Solution pour l'anticorps secondaire

Préparer une solution à 2% SAB + 1% Tween 20 dans 97 mL de PBS (2 g BSA + 1 mL de Tween 20 + 97 mL de PBS – préparer 10 mL par plaque) et ajuster pH à 7.4

2.2.2 Méthode pour tester la chimiosensibilité

2.2.2.1 Principe

Cette étude permet l'identification de composés avec une activité antipaludique. Cela est réalisé en déterminant l'activité *in vitro* de plusieurs composés testés contre les stades sanguins asexués de *Plasmodium falciparum* à l'aide d'un test ELISA HRP-2 (Histidine-rich protein 2) double site en sandwich. C'est un essai d'inhibition de la croissance qui évalue la réplication du parasite (37).

La protéine HRP-2 est produite lorsque le parasite se réplique, et peut être utilisée comme un marqueur substitut de la croissance parasitaire au sein de cultures exposées à différentes concentrations d'antipaludiques.

En biologie moléculaire un test ELISA (Enzyme-linked immune sorbent assay) dit en “sandwich” permet la détection d’antigènes (38).

Il permet d’obtenir rapidement des mesures sensibles et spécifiques en quantifiant la production des molécules biologiques (39).

Deux anticorps monoclonaux commercialement disponibles et optimisés pour le test de de chimio sensibilité *in vitro*, ont été utilisés (40).

Nous avons intégré la chloroquine (sel de chloroquine diphosphate SIGMA Aldrich Co., *Life Science*; lot BDBG0245V et PM= 515.86 g/mol) comme comparateur dans chacun des essais pour contrôler la performance de l’essai.

2.2.2.2 Description

JOUR 1: PREPARATION DES ECHANTILLONS

❖ ETAPE 1 : « Coating » des plaques ELISA

1] Diluer les anticorps primaires **IgM** à la concentration de **1.0 µg/mL** dans PBS 1X.

10 mL par plaque sont nécessaires, pour 12 plaques préparer 120 mL au total, pour être confortable dans l’étape de pipettage, 2 mL peuvent être ajoutés (122 mL ici au total).

Si la solution originale possède une concentration initiale de **9.2 mg/mL**:

- Nous obtenons un facteur de dilution de : $9200 \mu\text{g/mL} : 122 = 75,41$
- $1000 \mu\text{L} : 75 = 13,33 \mu\text{L}$
- Mélanger avec du PBS à hauteur des 122 mL.

2] Transférer à l’aide d’une pipette multicanaux, **100 µL** par puits de la solution d’anticorps dilués à la plaque ELISA.

3] Sceller les plaques et incuber à 4°C **durant la nuit**. Retirer le contenu des plaques ELISA et laisser sécher.

4] Ajouter **200 µL** de solution bloquante par puits et incuber à température ambiante pendant **2 heures**, retirer la solution, et laisser sécher (voir la section mise en place de la solution bloquante).

5] Laver les plaques 3 fois avec du **PBS/Tween** (200µL/puits), laisser sécher, les sceller sous vide, à l'aide d'un plastique et les congeler à -20°C, ne pas excéder 4 semaines de conservation de préférence (voir préparation de la solution PBS/Tween à 0,5%).

❖ ETAPE 2 : Traitement et Dilution des échantillons

⚠ Sous la hotte.

6] Si les composés sont sous forme de poudre, les diluer dans un solvant. De nombreux composés sont solubles dans le DMSO et la plupart des composés de cette étude sont dissous dans le DMSO.

Concernant la première famille constituée des métabolites myxobactériens:

- 3 composés [**3053**(PM= 481,6237), **3345**(PM = 467,5971), et **3438**(PM = 360,4489)] ont été isolés et sont dérivés des structures Pyxidienone et Pyrazinone. Ces 3 composés furent commercialement disponibles sous forme de poudre. Ils ont été dilués dans le méthanol car ils n'étaient pas solubles dans le DMSO ; avec une concentration de départ de 50 mM.
- Le composé Chlorotonil A et ses 8 dérivés TAFE furent disponibles dans le DMSO aux concentrations de départ respectives de 1 et 10 mM.

A propos de la 2^{ème} famille, les dérivés du *Penicillium* (3381, 3382, 3383 et 3385) furent également disponibles dans le DMSO à la concentration de départ de 10 mM.

Le contrôle Chloroquine fut disponible sous forme de poudre. Nous l'avons dilué dans de l'eau distillée pour atteindre la concentration de départ de 50 mM.

7] Diluer ensuite dans du milieu complet, (cette étape de dilution dépend de la toxicité) pour atteindre l'ordre du μM .

Après cette étape de dilution 1:100, dans le milieu complet:

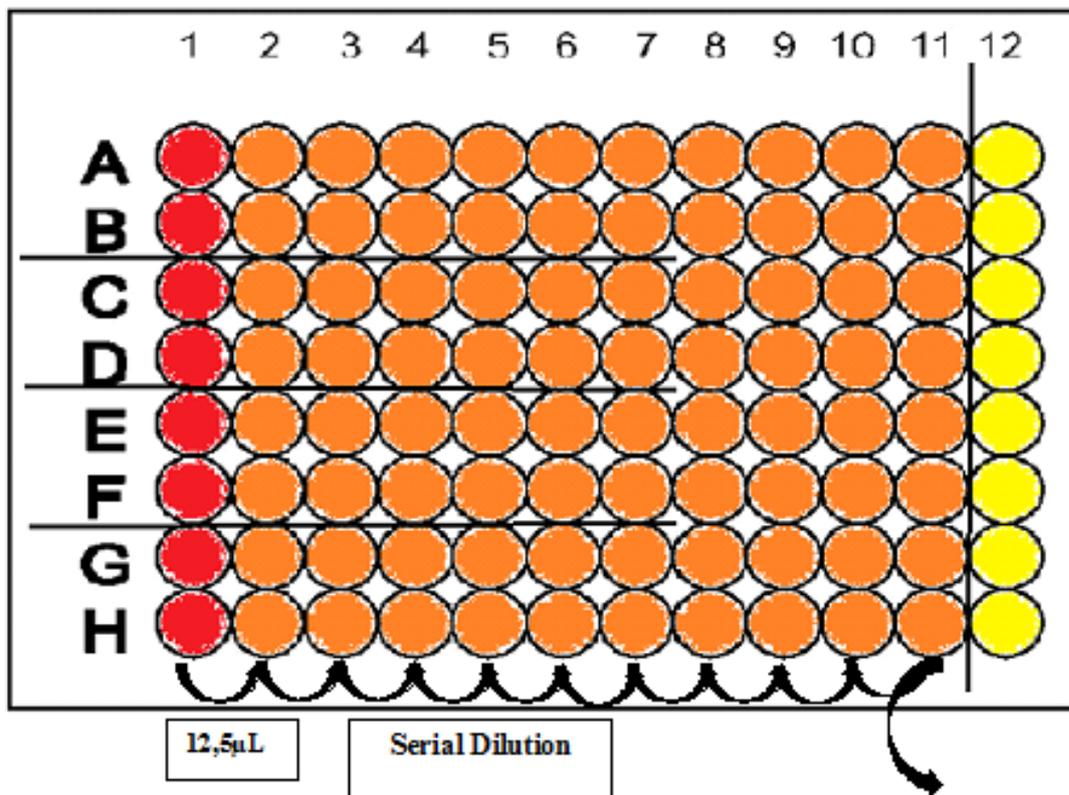
- Les composés 3053, 3345 et 3438 doivent atteindre une concentration de 500 μM .
- Le composé Chlorotonil A, une concentration de 10 μM et ses dérivés 100 μM .
- Les dérivés du *Penicillium*, une concentration de 100 μM .

Le contrôle Chloroquine a été dilué 1:1000 dans du milieu complet.

8] Labelliser les plaques comme suit (Les composés sont distribués en duplicat):

<u>Strain</u> , <u>Initials</u>	C
Name of the <u>drug</u> , concentration	O
Name of the <u>drug</u> , concentration	N
Name of the <u>drug</u> , concentration	T
Name of the <u>drug</u> , concentration	R
Name of the <u>drug</u> , concentration	O
Name of the <u>drug</u> , concentration	L

9] Suivre le plan de distribution suivant:



- 38 μL of the compound in duplicate
- 25 μL of medium first and then serial dilution of the compounds
- 25 μL of complete medium only

Et congeler les plaques à -20°C .

JOUR 2: ETAPE D'INCUBATION

❖ ETAPE 3

10] Utiliser une culture correctement synchronisée au stade ring (de préférence avec la méthode). Prélever une goutte dans un tube Eppendorf® pour évaluer la parasitémie.

11] Evaluation de la parasitémie

- La densité parasitaire doit être équivalente à 0,05 %, 1,5% hct.
- La parasitémie peut être évaluée grâce à la technique du FACS ou à l'aide d'une goutte épaisse et d'un microscope.
- En utilisant un compteur cellulaire manuel, compter toutes les cellules sur le champ de vision (facilité si il y a environ 100 érythrocytes par champ). Au minimum 1000 érythrocytes sont comptés, pour obtenir une bonne estimation de la parasitémie de notre culture.

12] Traitement des plaques de culture:

Les conditions de départ devant être vérifiées:

- **1,5%** d'hématocrite
- **0,05%** parasitémie
- **20 ml** par plaque

Par exemple: pour 4 plaques nous préparerons 85 mL de mélange.

100% —→ 85 mL

1,5% —→ **X**

X est la quantité totale de sang à l'intérieur du mélange (1275 µL).

Si la parasitémie de la culture est par exemple de **1.8%**.

Nous avons divisé **1.8: 0,05** pour obtenir le facteur de dilution: **36**.

1275: 36= 35,42 µL (sang parasité pour atteindre 0.05%)

Volume total de sang– sang parasité = Volume de sang frais

1275 – 35,42 = 1239.58 µL

Finalement, pour le mélange:

- 85 mL de milieu complet
- 35.42 µL provenant du culot de notre culture de *P. falciparum*.
- 1239.58 µL de sang frais

- Décongeler les plaques contenant les composés.
- Distribuer **200 µL** du milieu dans chaque puits.
- ⚠ **Incubation des plaques durant 3 jours à l'incubateur (37°C, 5% de CO₂ et 5% d'O₂, 98% d'humidité)!**
- Après les 3 jours, les plaques subissent un processus de congélation-décongélation avant l'étape d'analyse.

JOUR 6: ETAPE D'ANALYSE

❖ ETAPE 4 : Ajout de l'échantillon

13] Transférer **100 µL** d'échantillon de la plaque de culture à la plaque ELISA préalablement recouverte d'anticorps primaires. (Après décongélation des plaques)

⚠ 3D7= 50 µL d'échantillon + 50 µL d'eau distillée

Dd2= 100 µL d'échantillon

14] Incuber durant 1 heure à température ambiante dans une chambre humide.

15] Laver 3 fois avec du **PBS/Tween** (200 µL/puits) et laisser sécher.

❖ ETAPE 5 : Dilution de l'anticorps conjugué et ajout à la plaque ELISA

16] Diluer l'anticorps secondaire (MPFG-45P, Immunology Consultants Laboratories, Inc, Newberg, OR, USA) à la concentration de **0,05 µg/mL** dans la solution diluante (Voir la section mise en place).

⚠ L'activité du conjugué peut varier d'un lot à un autre. Lorsque vous utilisez un nouveau lot, essayer différentes concentrations pour le conjugué afin de trouver la dilution optimale.

17] Transférer **100 µL** de solution d'anticorps dilués par puits à la plaque ELISA en utilisant une pipette multicanaux.

18] Incuber **1 heure** à température ambiante dans une chambre humide.

19] Laver 3 fois avec du **PBS/Tween** (200 µL/puits) et laisser sécher.

❖ ETAPE 6 : Ajout du substrat et lecture de la plaque

20] Ajouter 100 µL par puits de chromogène TMB (Solution de TMB de référence Zymed Lab., Inc., San Francisco, CA, USA) incubé pendant **5 à 10 minutes dans le noir**, à température ambiante.

21] Stopper la réaction avec **50 µL d'acide sulfurique à 1M**.

21] Lire l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm.

2.3 Test de la cytotoxicité

2.3.1 Matériels pour tester la cytotoxicité

Equipement

- Incubateur Hera Cell 150i Thermo electron corporation (37°C, 5% CO₂ and 5% O₂, 98% d'humidité)
- Centrifugeuse
- Un lecteur de plaque ELISA (avec un filtre de référence 570 nm et 620 nm)
- Un Shaker pour microplaques
- Une hotte à flux laminaire Hera safe

Mise en place

- **DMEM Milieu complet**
Ajouter 55 mL de FBS inactive dans 500 ml de DMEM. Bien mélanger.
 - **PBS**
 - Dissoudre 2 comprimés de PBS dans 1 L d'eau stérile.
 - Bien mélanger et filtrer sous la hotte avec un filtre de 0,22 µm
-

-
- Des flasques de culture cellulaire jaune T-75 (avec une aire de croissance de 75 cm² et un volume total de travail de 21 mL)
 - Des flasques de cultures cellulaires rouges T-25
 - Pipettes
 - Tubes stériles
 - Microscope inverse Wild Heerbrugg (obj: DiN 0.25)
 - Un bain marie atteignant une température idéale de 37°C
 - Cryo-tube
 - Un compteur manuel
 - Hémocytomètre (chambre Tiede)
 - pipette multicanaux 12 puits, pipette de 200 µL et cônes
 - Tube falcon
 - Tube Eppi de 1 mL
- Labeliser la bouteille “ PBS stérile”.
 - Conserver la bouteille à 4°C pour une longue utilisation.
- **Solution au rouge neutre**
 - Diluer 0.45 mL de la solution stock de rouge neutre (3,3 mg/ml) avec 29.55 mL de DMEM milieu complet
- # 30 mL sont suffisants pour une plaque
- ⚠ La solution de travail au rouge neutre doit être fraîchement préparée.
- **Solution de lyse **ETAPE CRITIQUE****
- # Etre prudent lorsque l'on mixe de l'eau avec un acide!
- Pour 25 mL de solution

- Mettre **en premier** lieu 12.25 mL d'eau distillée (49 %)
- **Puis**, 12.5 mL de méthanol (50%)
- Et **enfin** 250 µL acide acétique (1%)

Matériels et réactifs

- Cellules HeLa (lignées cellulaires)
 - Rouge neutre (3-amino-7-diméthylamino-2-méthyl-phenazine hydrochloride)
 - Comprimés de PBS
 - Trypsin-EDTA
 - Colorant Trypan Blue (0.4%) Gibco
-

-
- Milieu Dulbecco
 - FBS
 - Acide acétique
 - Ethanol
 - Composés qui seront testés
-

2.3.2 Méthode pour tester la cytotoxicité

2.3.2.1 Principe

Cet essai donne une estimation quantitative de la viabilité cellulaire. Il est basé sur l'absorption du Rouge neutre. L'essai au Rouge neutre est l'un des tests de cytotoxicité les plus utilisés (41).

Cette procédure est basée sur la capacité des cellules viables à incorporer et lier le colorant rouge neutre dans leurs lysosomes (42).

La plupart des cellules primaires et des lignées cellulaires d'origines diverses devraient être utilisés.

En ce qui concerne cette étude, une culture en monocouche a été utilisée : les cellules HeLa. En effet, ce test peut être standardisé pour un criblage de composés en plaque de microtitrage de 96 puits et adapté à un lecteur spectrophotométrique de microplaques (41).

La chloroquine a été utilisée comme contrôle des composés testés, ainsi que le DMSO dans le but d'exclure que l'effet cytotoxique est dû au solvant.

2.3.2.2 Description

JOUR 1: ENSEMENCEMENT DES CELLULES (30min)

❖ ETAPE 1 : Lavage des cellules

1] Ouvrir la hotte, allumer la lumière et le flux d'air, désinfecter la surface de travail et placer les pipettes sous la hotte après désinfection.

2] Sortir le PBS du réfrigérateur et l'aliqoter sous la hotte dans un tube falcon de 50 mL. Préchauffer le DMEM complétement avec 10% de FBS et la TE à 0,05% dans un bain marie au moins 15 minutes.

3] Retirer la flasque de culture de l'incubateur, la fermer hermétiquement, et vérifier la confluence de la culture à l'aide d'un microscope inversé, qui doit osciller entre 70 et 80%. Vérifier également l'absence de contamination.

4] Laver les cellules avec 5 mL de CMF-PBS (pour calcium-magnesium free-phosphate buffered saline) pour une flasque T-25 et avec 15 mL pour une flasque T-75, dans le but d'éliminer toutes traces de milieu. Aspirer avec une pipette stérile.

❖ **ETAPE 2 : Détachement des cellules CRITIQUE**

⚠ Cette étape est appelée Trypsination ou Passage, elle doit être conduite très rapidement.

5] Ajouter 1 mL de trypsine EDTA pour une flasque T-25 et 3 mL pour une T-75. Agiter doucement et placer la flasque à l'incubateur pendant 2 minutes.

6] Après 2 minutes, fermer la flasque, taper légèrement la flasque dans le but de correctement détacher les cellules et vérifier le détachement effectif à l'aide d'un microscope inversé. Si le détachement n'est pas complet mettre la flasque de nouveau à l'incubateur 1 minute.

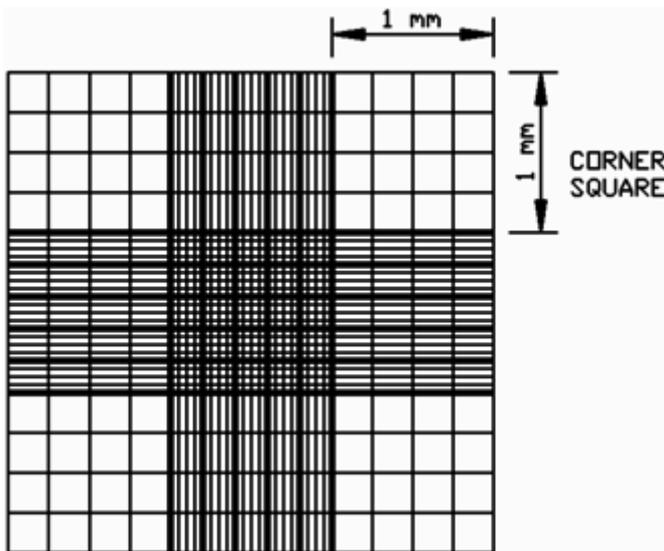
7] Transférer le contenu de la flasque dans un falcon tube de 50 mL. Prélever 20 µL de la suspension cellulaire et transférer cette quantité dans un tube Eppendorf® de 1,5 mL pour le comptage. Distribuer 10-15 mL de milieu pour stopper l'action de la trypsine. Ce moment est optimal pour compter les cellules.

8] Centrifuger le flacon à 100g Durant 5 minutes. Enlever le surnageant (Prendre les précautions nécessaires pour ne pas aspirer le culot cellulaire). Resuspendre le culot dans 10-15 mL de milieu de culture.

❖ ETAPE 3: Comptage des cellules

9] Mélanger 10 μL de la suspension cellulaire provenant de l'éppi avec 10 μL de Bleu de trypan à 0.04%. Prélever 10 μL de ce mélange et remplir doucement la chambre. La solution gagnera toute la chambre par capillarité.

10] Focaliser l'objectif du microscope (10X) sur les lignes de la grille de la chambre. Plus précisément sur un ensemble de 16 carrés, comme indiqué ci-dessous:



Et en utilisant un compteur à main, compter le nombre de cellules dans chaque ensemble de 16 carrés.

11] Travailler avec la moyenne des quatre carrés. Cette moyenne est équivalente au nombre de cellules $\times 10^4 / \text{mL}$: Moyenne \times solution totale $\times 10^4$

A titre d'exemple:

Si le nombre total de cellules est 145

La densité cellulaire est

$$(145/4) \times 10 \text{ mL} \times 10^4 = 36,25 \times 10^5 / 10 \text{ mL}$$

$$= 36,25 \times 10^4 / \text{mL}$$

❖ **ETAPE 4: Dilution des cellules**

12] Diluer les cellules avec du milieu complet jusqu'à atteindre **200 000 cellules/mL**, préparer entre 12 et 15 mL par plaque d'une suspension cellulaire uniforme.

Exemple: 362 500 cellules/ mL dilué pour atteindre 200 000 cellules/mL (facteur de dilution 1.8)

Pour une plaque: préparer 15 mL de suspension cellulaire

$$15 \text{ mL} / 1.8 = 0.8 \text{ ml cellules} + 14.2 \text{ mL de milieu}$$

❖ **ETAPE 5: Distribution des cellules**

13] Distribuer à l'aide d'une pipette multicanaux 100 µL de suspension cellulaire dans la plaque de 96 puits.

14] Agiter légèrement la suspension cellulaire et la placer dans un réservoir stérile.

15] Couvrir la plaque et incuber les cellules dans des conditions adéquates (température, CO₂, atmosphère humidifiée) une monocouche de semi-confluente, généralement pendant la nuit. Cette période d'incubation permet d'obtenir un bon rendement cellulaire, l'adhérence et la croissance exponentielle.

JOUR 2: DILUTION EN SERIE DES COMPOSES (30min)

16] Après incubation, vérifier la croissance correcte des cellules sous un microscope inversé à contraste de phase.

17] Préparer toutes les solutions à tester (par exemple la solution de Chloroquine) immédiatement avant utilisation, pour éviter tout problème lié à la stabilité et à la précipitation du composé. Travailler en conditions stériles.

Solution de travail Chloroquine (1 mM) Diluer la solution stock de chloroquine (50 mM) dans du milieu pour atteindre la concentration de 1 mM, requise pour notre solution de travail. On obtient un facteur de dilution de 50. Pour une plaque: préparer 400 μ l (2x 188 μ L)

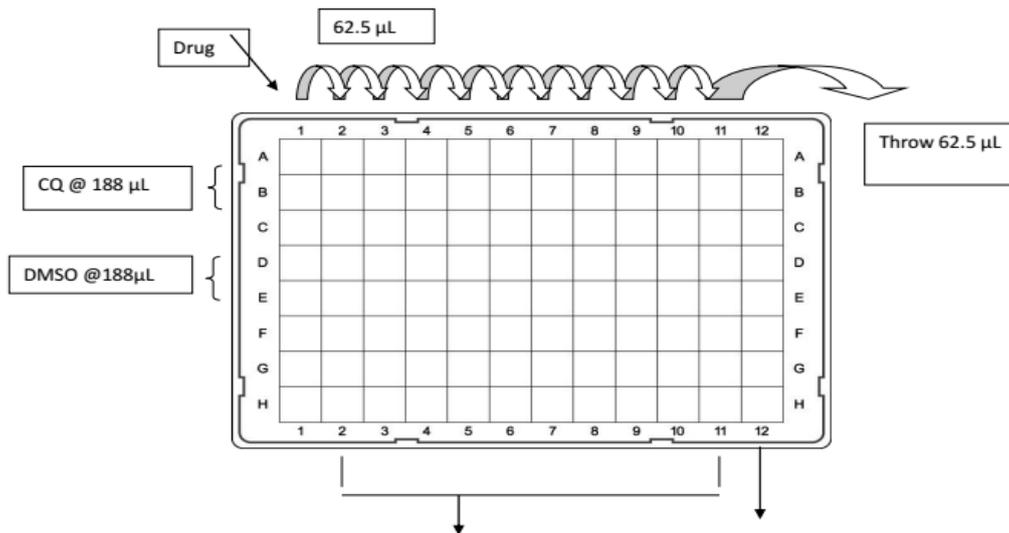
$400 \mu\text{L} / 50 = 8 \mu\text{L}$ solution stock de Chloroquine + 392 μ L milieu

18] Sous des conditions stériles, aspirer le milieu de culture des plaques. Ajouter **125 μ L** de milieu à tous les puits, d'une plaque de culture de 96 puits, à l'exception de la première colonne.

19] Ajouter **188 μ L** de Chloroquine diluée et de DMSO dans les puits désignés.

20] Réaliser la dilution en série comme décrit ci-dessous. Laisser la dernière colonne avec uniquement 125 μ L de milieu.

21] Incuber la plaque dans des conditions appropriées, généralement pendant 24h.



JOUR 3: ESSAI AU ROUGE NEUTRE (3h)

22] Préparer la solution de travail au rouge neutre, comme spécifié ci-dessus (voir section Matériels et mise en place des Réactifs).

23] Aspirer le milieu usagé.

⚠ La partie finale de la procédure (22-31) n'a pas à être obligatoirement effectuée sous des conditions stériles ou avec du matériels stérilisés.

24] Ajouter dans chaque puits de la plaque **100 µL** de milieu rouge neutre.

25] Incuber la plaque pendant **3 h** dans des conditions de culture appropriées.

26] Enlever le milieu au rouge neutre.

27] Laver les cellules avec **100 µL** de **PBS** stérile par puits et enlever la solution de lavage en tapotant légèrement.

⚠ 28] Ajouter **100 µL** par puits de la solution à 50% d'éthanol et 1% d'acide acétique (voir la section Matériels et mise en place des réactifs).

29] Secouer la plaque rapidement à l'aide d'un shaker de plaques de micro titrage pendant au moins **10 min.**

30] Mesurer la DO du Rouge Neutre à **570 nm** (et le filtre référence à **620 nm**) à l'aide d'un lecteur de plaques de micro titration en spectrophotométrie.

31] Sauver les données dans un format de fichier approprié pour des analyses ultérieures.

2.4 Analyse des données

La phase d'analyse des données est similaire aux deux expériences.

Les valeurs de DO ont été collectées dans EXCEL. Dans un premier temps, les valeurs peuvent être évaluées en se concentrant sur la valeur du premier puits (contenant uniquement le composé, cette valeur est supposée être basse si le composé est actif et/ou toxique, en fonction du cas de figure). Puis dans un deuxième temps, l'augmentation ou non de ces valeurs en comparaison avec le premier puits peut être décrite.

Les données ont été traitées par le logiciel statistique « R program » avec un scripte HRP-2 ELISA, qui standardisé pour analyser les courbes effet-dose (ou DRC pour Dose Response Curves).

Finalement, nous avons pris en considération les résultats des contrôles de chaque plaque (variation ou répétabilité de la chloroquine et du DMSO) pour inclure ou exclure les résultats du composé (comme écrit ci-dessous).

III- Résultats et discussion

3.1 Résultats et discussion autour de la chimio sensibilité

3.1.1 Description et sélection des contrôles

3.1.1.1 Description

L'activité ainsi que la cytotoxicité des deux familles de composés ont été testés. La première famille est constituée de 12 composés qui sont des métabolites myxobactériens.

- 3 composés ont été isolés de la Myxobactérie et dérivent des structures Pyxidienone et Pyrazinone: **3053**, **3345** et **3438**, avec une concentration de départ de 55 556 nM.
- Et 8 autres composés qui sont des dérivés du macrolide myxobactérien chlorotonil A : **TAFE 049F1**, **TAFE 049F2**, **TAFE 069F1**, **TAFE 070F1**, **TAFE 071F1**, **TAFE 072F1**, **TAFE 075F1** et **TAFE 076F3**, avec une concentration de départ de 11 111 nM. **TAF ChA** (Chlorotonil A) a été testé à la concentration de départ de 1 111,1 nM.

La deuxième famille est composée de 4 dérivés du *Penicillium* : **3381**, **3382**, **3383** et **3385** à la concentration de départ de 11 111 nM.

Tous les composés ont été testés au moins 3 fois contre 2 souches de *P. falciparum* : 3D7 (chloroquino sensible) et Dd2 (chloroquine et sulfadoxine-pyriméthamine résistante).

3.1.1.2 Sélection des Contrôles

La chloroquine a été utilisée comme contrôle dans le test de composés à la concentration de départ de 5555.6 nM. Pour chaque expérience, la chloroquine a été préparée à partir de deux stocks différents et indépendants.

TABLEAU 2 Sélection des contrôles chloroquine et moyenne de leurs CI₅₀

TABLEAU 2A. Sélection des contrôles chloroquine

Chloroquine	Série n°1		Série n°2		Série n°3	
CI ₅₀ (nM) contre les souches	3D7	Dd2	3D7	Dd2	3D7	Dd2
Stock n°1	Non évaluable	56.08	1.55	308.76	11.23*	359.8*
Stock n°2	2.87	48.43	0.7**	216.17	2.33	279.50

TABLEAU 2B. Moyenne des CI₅₀ de la chloroquine

Moyenne des CI ₅₀ (nM)	3D7	Dd2
Stock n°1	6.39	241.55 +/-162.63
Stock n°2	1.97 +/- 1.13	181.37 +/- 119.40

Légende: (*) Ces valeurs ont été exclues ; (**) cette valeur a été arrondie

Pour la souche Dd2, nous attendions concernant la chloroquine une CI₅₀ autour de 200 nM. Nous avons finalement décidé de garder les résultats des plaques qui possédaient une CI₅₀ contrôle pour la chloroquine, comprise entre 50 et 350 nM.

Pour la souche 3D7, nous attendions concernant la chloroquine une CI₅₀ autour de 4 nM et nous avons finalement validé les résultats des plaques qui possédaient une CI₅₀ contrôle pour la chloroquine, comprise entre 1 et 7 nM.

3.1.2 Résultats et Discussion.

La sélection des contrôles effectifs nous a permis de valider nos plaques. Après validation des plaques, les résultats peuvent alors être analysés. Les résultats des plaques invalidées, étant exclus de l'analyse.

TABLEAU 3 Concentrations inhibitrices 50 des composés testés contre les souches 3D7 et Dd2 de *P.falciparum*

Composés	Souche	Activité	CI ₅₀ a (nM)	CI ₅₀ b (nM)	CI ₅₀ c (nM)	Moyenne (nM)	SD
TAFE 049F1	3D7	actif	87.18	100.29	*	93.74	
	Dd2	actif	718.69	88.95	84.01	297.22	+/- 365.01
TAFE 049F2	3D7	actif	86.82	54.62	*	70.72	
	Dd2	actif	634.43	244.61	60.75	313.26	+/- 292.94
TAFE 075F1	3D7	actif	53.43	141.85	17.52	70.93	+/- 63.99
	Dd2	actif	6.46	62.57	25.06	31.36	+/- 28.58
TAFE 076F3	3D7	actif	54.41	127.32	58.04	79.92	+/- 41.09
	Dd2	actif	4.56	63.04	37.51	35.04	+/- 29.31
TAF ChA	3D7	actif	14.61	11.25	27.03	17.63	+/- 8.31
	Dd2	actif	4.13	24.83	23.78	17.58	+/- 11.66

Légende: (*) Actif dans les 4 premiers puits en comparaison avec le dernier puits, mais non évaluable par le programme R.

Le composé Chlorotonil A (TAF ChA) agit *in vitro* contre les souches de laboratoire de *P. falciparum*, mais possède une faible solubilité (32). Les résultats obtenus sont similaires à un papier précédent, dans lequel la Chlorotonil A fut/ a été fortement active avec une concentration inhibitrice 50 comprise entre 4 et 32 nM.

Notre étude a également suggéré que le composé chlorotonil A était très actif avec une concentration inhibitrice à 50% comprise entre 4,13 et 27,03 nM.

Le MMV a mis en relief des notions clefs nécessaires au contrôle et à l'éradication du Paludisme. L'une de ces notions clefs est de cibler les stades sanguins hépatiques asexués du *Plasmodium* avec des indications concernant la puissance (43). En ce qui concerne les critères de puissance cellulaire, un hit validé devrait posséder une concentration efficace produisant 50% de l'effet maximal observé (CE₅₀) inférieure à 1 µM (voire inférieure à 100 nM pour un début de tête de série (early lead) contre des souches sensibles et multi résistantes de *Plasmodium* spp (8).

Notre essai d'inhibition a démontré que nos composés actifs (la famille de dérivés de la Chlorotonil A) remplissent cette notion clef. Ce processus de découverte de nouveaux médicaments, a établi une première étape pour construire un solide cahier des charges.

En outre ce critère concernant le seuil de la CE₅₀, un hit doit remplir au moins une autre notion clef comme posséder un nouveau mécanisme d'action par exemple (43).

A ce jour, le mécanisme d'action de la chlorotonil A n'a pas été élucidé. Dans un papier précédent, la perte d'activité constatée avec la forme déhalogénée suggère un rôle primordial du pharmacophore contenant un motif chloré (32).

Il a également été rapporté que le composé chlorotonil A agit contre des isolats cliniques provenant de patients de Lambaréné au Gabon possédant une structure génétique diverse, une région connue pour son niveau élevé de résistance à la chloroquine et la sulfadoxine-pyriméthamine.

Toutes ces déclarations étayent la théorie d'un mécanisme d'action insolite pour le composé chlorotonil A vis-à-vis de comparateurs tels que l'artésunate ou encore la chloroquine.

Parmi les 16 composés testés (mis à part le composé chlorotonil A), 4 composés agissent *in vitro* contre les souches de laboratoire de *P. falciparum* (**Tableau 3**).

Ils sont tous dérivés du composé chlorotonil A et possèdent une meilleure hydro solubilité. Après avoir établi les propriétés pharmacodynamiques, pour une plus ample optimisation, les propriétés pharmacocinétiques doivent être également explorées. Il est essentiel pour un

composé de présenter un équilibre entre son hydro solubilité (pour la phase de dissolution) et sa lipo solubilité (qui permet de traverser les membranes lipophiles des organes cibles) avec l'objectif de démontrer une biodisponibilité acceptable.

Le composé le plus puissant est **TAFE 075F1**. Ce dérivé a inhibé puissamment *in vitro* la croissance des parasites des souches chloroquino-sensible (3D7) et chloroquino-résistante (Dd2) de *P. falciparum*

Les CI_{50} obtenues ont été respectivement 70.93 +/- 63.99 nM et 31.36 +/- 28.58 nM pour 3D7 et Dd2. Le prochain champ d'investigation concernant ce composé, sera l'élucidation de son mécanisme d'action.

Connaître la cible moléculaire d'un nouveau composé peut permettre d'anticiper certaines faiblesses lors du processus de recherche et développement, d'optimiser spécifiquement le hit en lead et constitue une garantie que la plupart des voies (métaboliques) ont été explorées ce qui est important pour les problèmes de résistance. Cependant de nos jours, pour l'aire thérapeutique du paludisme et son pipeline diversifié en constante mutation, il semble plus avantageux d'être en présence d'un produit efficace que de connaître sa cible moléculaire, en prenant en considération l'exemple à succès de l'artémisinine (6).

Les métabolites du *Penicillium* testés n'ont pas (dé)montré d'activité dans notre essai à la plus haute concentration testée. Des résultats publiés précédemment (33), présentent des métabolites similaires qui agissent lorsqu'ils sont testés contre une enzyme de *P. falciparum* la *pfGLOI*. Une des explications pourrait résider dans le fait que, nos métabolites testés agissent contre cette même enzyme mais ne sont actifs lorsqu'ils sont testés dans un essai cellulaire global.

Cela peut signifier que nos composés testés agissent contre la même enzyme mais ne sont néanmoins pas actifs lorsqu'ils sont testés dans un essai phénotypique incluant la cellule entière. Ceci constitue une indication que les métabolites ne pourraient pas traverser les membranes des érythrocytes et du parasite et donc n'atteindraient finalement pas l'enzyme pour exercer leur action. Concernant les composés totalement inactifs, la différence entre les essais utilisés doit être prise en considération mais aussi les limitations concernant : la condition des parasites, le choix de la dilution et la façon de pipeter.

3.2 Résultats et discussion autour de la cytotoxicité

3.2.1 Sélection des contrôles

Avant de démarrer l'étude, une série test a été réalisée à l'aide des contrôles (chloroquine et DMSO), avec 2 dilutions en série distinctes : de raisons 2 et 3. La densité optique de l'absorption du rouge neutre a été mesurée à 492 nm (avec et sans le filtre de référence à 620 nm) et à 570 nm (avec et sans le filtre de référence à 620 nm) ;

Nous avons finalement sélectionné le couple de filtres 570/620 nm pour notre expérience.

3.2.2 Résultats et discussion

TABLEAU 4 Résultats de la cytotoxicité des composés actifs testés

Composés	Concentration de départ (μM)	Type de cellules	Cytotoxicité- Essai au Rouge Neutre (2 séries)
TAF ChA	10	HeLa	non cytotoxique à la plus haute concentration testée
TAFE 049F1	100	HeLa	non cytotoxique à la plus haute concentration testée
TAFE 049F2	100	HeLa	Légèrement cytotoxique à la plus haute concentration
TAFE 075F1	100	HeLa	non cytotoxique à la plus haute concentration testée
TAFE 076F3	100	HeLa	non cytotoxique à la plus haute concentration testée

La concentration de départ utilisée pour l'essai de cytotoxicité est 9 fois plus élevée que dans ELISA double site HRP-2 en sandwich. En ce qui concerne les critères de cytotoxicité, un hit devrait présenter un indice de sélectivité de 10 entre sa CC_{50} (concentration présentant 50 % de l'effet cytotoxique) et sa CE_{50} pour *Plasmodium* spp. La différence entre les 2 concentrations n'est pas seulement une manière d'évaluer la cytotoxicité mais aussi une manière d'évaluer la fenêtre thérapeutique. Un composé présentant un indice de sélectivité élevé est considéré comme étant un meilleur lead. Cette sélectivité doit augmenter lorsque l'on passe du hit validé à un early lead.

Aucun composé testé n'a démontré de cytotoxicité à la plus haute concentration. Les composés **TAFE 049F1** et **TAFE 049F2** furent légèrement cytotoxiques à la plus haute concentration (**Table 4**). Ces valeurs doivent être confirmées dans des expériences supplémentaires.

Le composé le plus puissant **TAFE 075F1** n'est pas cytotoxique à la plus haute concentration.

La lignée de cellules immortelles HeLa couramment utilisées dans la recherche scientifique est utilisée ici comme un marqueur de substitution. Les résultats de cytotoxicité contre cette lignée cellulaire sont ensuite extrapolés. En comparaison aux cellules primaires, les lignées cellulaires sont en général plus faciles à cultiver avec un débit élevé mais elles présentent les caractéristiques de cellules dédifférenciées. La sécurité des composés doit néanmoins être investiguée, au-delà de leur non cytotoxicité contre les cellules HeLa, dans des modèles supplémentaires (44).

Conclusion

Dans les premiers stades de développement de composés antipaludiques, obtenir comme point de départ un composé actif, est une étape critique (8).

L'objectif principal de cette étude de criblage à moyen débit fut d'identifier des composés avec une activité antipaludique. Les deux familles de composés choisies pour illustrer dérivent de produits naturels. Les bibliothèques de produits sont une source riche de composés prometteurs pour une application clinique (32).

Les 4 dérivés du *Penicillium* testés pour notre essai ne sont pas actifs contre *P. falciparum*. D'autres dérivés pourraient s'avérer (être plus) actifs et seront criblés dans des expériences supplémentaires. En ce qui concerne nos résultats, ils ne représentent pas des points de départ suffisamment intéressants. Parmi les métabolites mycobactériens, les trois composés isolés des structures du Pyxiedone et de la Pyrazinone ne se sont pas non plus avérés actifs. Le composé chlorotonil A fut identifié en amont comme étant actif contre les formes asexuées de *P. falciparum* issues de souches de laboratoire et d'isolats cliniques à un niveau nanomolaire, ainsi que contre les gamétocytes de stade V.

Le composé chlorotonil A présente un inconvénient majeur, il est faiblement soluble dans l'eau et par conséquent sûrement très peu biodisponible. Dans cette thèse des composés chimiquement dérivés de la chlorotonil A ont été testés et ont démontré une meilleure solubilité que le composé parent. TAFE 075F1 et TAFE076F3 sont plus solubles dans l'eau que le composé Chlorotonil A et ont démontré une activité similaire contre *P. falciparum*. Nous aspirons donc à une meilleure biodisponibilité de ces composés *in vivo*. En outre, ils n'ont pas démontré à la plus forte concentration testée de cytotoxicité contre la lignée cellulaire HeLa, ce qui constitue également un avantage certain pour construire une tête de série (antipaludique) de qualité. Des expériences supplémentaires permettront de confirmer ces hypothèses et si ces dérivés sont réellement plus actifs dans les modèles antipaludiques *in vivo*.

Références

1. WHO | Malaria [Internet]. WHO. [cited 2014 Dec 22]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
2. WHO | World Malaria Report 2015 [Internet]. WHO. [cited 2016 May 8]. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>
3. malariamap.gif (Image GIF, 500 × 356 pixels) [Internet]. [cited 2016 May 8]. Available from: <http://www.rollbackmalaria.org/microsites/gmap/malariamap.gif>
4. Global technical strategy for malaria 2016-2030 - 9789241564991_eng.pdf [Internet]. [cited 2016 May 10]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176712/1/9789241564991_eng.pdf?
5. RBM_AIM_Report_A4_EN-Sept2015.pdf [Internet]. [cited 2016 May 10]. Available from: http://www.rollbackmalaria.org/files/files/aim/RBM_AIM_Report_A4_EN-Sept2015.pdf
6. Rosenthal PJ. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol.* 2003 Nov;206(Pt 21):3735–44.
7. Laska M, Rivas Bautista RM, Hernandez Salazar LT. Gustatory responsiveness to six bitter tastants in three species of nonhuman primates. *J Chem Ecol.* 2009 May;35(5):560–71.
8. Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Nov;14(11):751–8.
9. Carnevale P, Robert V. Les anophèles: biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. Marseilles: IRD Éditions; 2009.
10. Njiru BN, Mukabana WR, Takken W, Knols BG. Trapping of the malaria vector *Anopheles gambiae* with odour-baited MM-X traps in semi-field conditions in western Kenya. *Malar J.* 2006;5:39.
11. CDC - Malaria - About Malaria - Biology - Malaria Parasites [Internet]. [cited 2016 May 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>
12. Universalis E. PALUDISME ou MALARIA [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cited 2016 May 8]. Available from: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/paludisme-malaria/>
13. Poly parasitologie [Internet]. [cited 2016 May 8]. Available from: <http://fr.slideshare.net/mutangachuk/poly-parasitologie>
14. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J.* 2014;13:68.
15. *Plasmodium falciparum* : taxonomie et génétique, aperçu des questions actuelles - 39004.pdf [Internet]. [cited 2016 May 8]. Available from: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_33-34/39004.pdf

16. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-Resistant Malaria. *J Infect Dis.* 2001 Sep 15;184(6):770–6.
17. 2001_6-7_720.pdf [Internet]. [cited 2016 May 10]. Available from: http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/1996/2001_6-7_720.pdf?sequence=1
18. 9789241549219_eng.pdf [Internet]. [cited 2016 May 8]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/163782/1/9789241549219_eng.pdf
19. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jan;15(1):66–78.
20. Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Int Health.* 2003 Oct 1;8(10):876–83.
21. Phase III fact sheet - reactive 251012 v 1 comments - MVI-GSK-RTSSfactsheetFINAL-web.pdf [Internet]. [cited 2016 May 8]. Available from: <http://www.malariavaccine.org/files/MVI-GSK-RTSSfactsheetFINAL-web.pdf>
22. Burrows JN, van Huijsduijnen RH, Möhrle JJ, Oeuvray C, Wells TNC. Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malar J.* 2013;12:187.
23. WHO | Drug resistance and containment [Internet]. WHO. [cited 2016 May 10]. Available from: http://www.who.int/malaria/areas/drug_resistance/en/
24. Okombo J, Kamau AW, Marsh K, Sutherland CJ, Ochola-Oyier LI. Temporal trends in prevalence of *Plasmodium falciparum* drug resistance alleles over two decades of changing antimalarial policy in coastal Kenya. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014 Aug 7;4(3):152–63.
25. Contribution à l'étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* à l'atovaquone-proguanil - document [Internet]. [cited 2016 May 8]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00130030/document>
26. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *N Engl J Med.* 2008 décembre;359(24):2619–20.
27. artemisinin_resistance_containment_2011.pdf [Internet]. [cited 2016 May 10]. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin_resistance_containment_2011.pdf
28. Straimer_et_al, Science_2014.pdf [Internet]. [cited 2016 May 8]. Available from: http://publicationslist.org/data/didier.menard/ref-172/Straimer_et_al,%20Science_2014.pdf
29. Wells TNC, Hooft van Huijsduijnen R, Van Voorhis WC. Malaria medicines: a glass half full? *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Jun;14(6):424–42.
30. Interactive R&D portfolio | Medicines for Malaria Venture [Internet]. [cited 2016 May 8]. Available from: <http://www.mmv.org/research-development/interactive-rd-portfolio>

31. Gerth K, Steinmetz H, Höfle G, Jansen R. Chlorotonil A, a macrolide with a unique gem-dichloro-1,3-dione functionality from *Sorangium cellulosum*, So ce1525. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(3):600–2.
32. Held J, Gebru T, Kalesse M, Jansen R, Gerth K, Müller R, et al. Antimalarial activity of the myxobacterial macrolide chlorotonil a. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Nov;58(11):6378–84.
33. Ishiyama A, Iwatsuki M, Yamamoto T, Miura H, Omura S, Otoguro K. Antimalarial tropones and their *Plasmodium falciparum* glyoxalase I (pfGLOI) inhibitory activity. *J Antibiot (Tokyo).* 2014 Jul;67(7):545–7.
34. Iwatsuki M, Takada S, Mori M, Ishiyama A, Namatame M, Nishihara-Tsukashima A, et al. In vitro and in vivo antimalarial activity of puberulic acid and its new analogs, viticolins A–C, produced by *Penicillium* sp. FKI-4410. *J Antibiot (Tokyo).* 2011 février;64(2):183–8.
35. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* 1979 Jun;65(3):418–20.
36. Mata-Cantero L, Lafuente MJ, Sanz L, Rodriguez MS. Magnetic isolation of *Plasmodium falciparum* schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized in vitro culture. *Malar J.* 2014;13:112.
37. Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M. Simple Histidine-Rich Protein 2 Double-Site Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Aug;49(8):3575–7.
38. Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E. Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *J Immunol Methods.* 1981 avril;42(1):11–5.
39. Desakorn V, Silamut K, Angus B, Sahassananda D, Chotivanich K, Suntharasamai P, et al. Semi-quantitative measurement of *Plasmodium falciparum* antigen PfHRP2 in blood and plasma. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997 Aug;91(4):479–83.
40. Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. Histidine-Rich Protein II: a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jun 1;46(6):1658–64.
41. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Methods.* 1985 Mar;9(1):7–9.
42. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1125–31.
43. Information required for 5-page submission to MMV - Call_for_LOIs_outline.pdf [Internet]. [cited 2016 Jun 11]. Available from: http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/essential_info_for_scientists/2015_Call_for_proposals/Call_for_LOIs_outline.pdf

44. The good, the bad, and the HeLa [Internet]. The Berkeley Science Review. [cited 2016 Jun 11]. Available from: <http://berkeleysciencereview.com/article/good-bad-hela/>

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2015/2016

Nom : N'GUESSAN

Prénom : Cécilia

Titre de la thèse : Evaluation de la chimio sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à des composés à visée antipaludique.

Mots-clés: *P. falciparum*, criblage *in vitro* ; culture parasitaire ; chimio sensibilité ; technique immuno enzymatique HRP-2 en double site sandwich ; cellules HeLa ; Rouge neutre.

Résumé: *Plasmodium falciparum* est l'espèce potentiellement mortelle du paludisme. Il est transmis à l'homme, par la piqûre d'un moustique : l'Anophèle femelle. La lutte contre ce problème de santé publique compte parmi ses volets, la découverte de nouveaux médicaments antipaludiques ; intimement liée, à la nécessité de surmonter l'émergence de résistance. Il est question ici d'évaluer la chimiosensibilité de *P. falciparum*, à des composés naturels issus d'un **criblage *in vitro*** (dérivés d'une myxobactérie et de l'espèce fongique *Penicillium*). L'évaluation de cette activité, est réalisée grâce à un essai d'inhibition de croissance du parasite, à l'aide d'une **technique immuno-enzymatique HRP-2 double site en sandwich**. Deux souches plasmodiales en **culture** de laboratoire sont utilisées : 3D7 et Dd2. Après l'activité, nous avons évalué la cytotoxicité des composés testés, à l'aide d'une culture de **cellules HeLa** et l'utilisation du **Rouge neutre** comme indicateur de la viabilité cellulaire. Parmi les 16 composés testés, 4 furent actifs *in vitro* contre les souches plasmodiales de laboratoire en culture. Deux d'entre eux n'ont présenté aucune cytotoxicité à la plus haute concentration testée soit 100 µM et deux d'entre eux furent légèrement cytotoxiques à la plus haute concentration testée (100µM). Ces 4 composés sont de bons points de départ pour constituer, après de plus amples améliorations, des têtes de série de qualité.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur El Moukhtar ALIOUAT, Laboratoire de Parasitologie

Assesseur(s) : Madame le Professeur Rebecca DEPREZ, Laboratoire de Chimie Générale

Membre(s) extérieur(s) : Madame Florence LEROUX, Docteur, Unité INSERM U1177, Institut Pasteur de Lille

